

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

Incorporación del DNA bacteriano en el genoma vegetal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Juan Sánchez Serrano

Madrid, 2015

TP
1984
005

José Juan Sánchez Serrano



* 5 3 0 9 8 6 2 8 3 2 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-014071-2

INCORPORACION DEL DNA BACTERIANO EN EL GENOMA VEGETAL

Departamento de Genética
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

5/84.

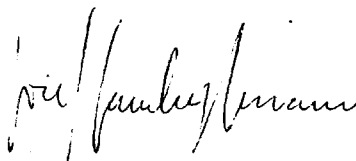
© José Juan Sánchez Serrano
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-39676-1983

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Cátedra de Genética. Facultad
de Ciencias Biológicas.

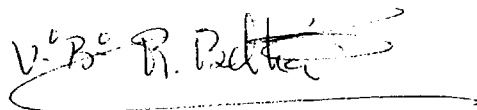
INCORPORACION DE DNA BACTERIANO EN EL GENOMA VEGETAL

Tesis Doctoral presentada por
José Juan Sánchez Serrano



Director Dr. R. Beltrá Martínez de Velasco

Madrid, 1982.



”

I

INDICE

»

II

	página
1 - INTRODUCCION	1
2 - MATERIALES Y METODOS	8
2.1 Medios de cultivo	9
2.2 Soluciones tampón	13
2.3 Soluciones Método Birnboim	14
2.4 Soluciones Método Southern	15
2.5 Soluciones nick translation	16
2.6 Soluciones aislamiento RNA	16
2.7 Soluciones síntesis cDNA	18
2.8 Bacterias	20
2.9 Pruebas de patogenicidad	23
2.10 Sensibilidad a agrocina 84	23
2.11 Producción de cetolactosa	24
2.12 Catbolismo de opinas	25
2.13 Cultivo de tejidos	26
2.14 Detección de opinas	26
2.14.1 Detección de agropina	26
2.14.2 Detección de octopina y nopalina	27
2.15 Plásmidos	28
2.15.1 Determinación de la presencia de plásmidos	28
2.15.2 Aislamiento y purificación de plásmidos	29

III

	página
2.15.3 Caracterización de plásmidos	32
2.16 Homologías entre plásmidos	37
2.16.1 Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa	37
2.16.2 Preincubación de los filtros	38
2.16.3 Marcaje radiactivo de DNA	38
2.16.4 Hibridaciones	39
2.17 Homologías RNA-DNA	40
2.17.1 Extracción de RNA	40
2.17.2 Síntesis y aislamiento de cDNA	41
2.17.3 Hibridación con cDNA	42
3 - RESULTADOS	44
3.2 Inoculaciones	52
3.3 Cultivo de raíces	52
3.4 Presencia de opinas en raíces inducidas por <u>A. rhizogenes</u> 15834	55
3.5 Plásmidos en <u>A. rhizogenes</u>	57
3.6 Homologías entre pRi15834 y pTiC58	63
3.7 Homologías entre pRi15834 y pTiACH5	78
3.8 Transcripción de DNA bacteriano en raíces inducidas por <u>A. rhizogenes</u> 15834	89
3.8.1 Extracción de RNA de raíces	89
3.8.2 Preparación del cDNA	90
3.8.3 Hibridación cDNA-DNA pRi15834	91

IV

	página
4 - DISCUSION	100
5 - RESUMEN	116
6 - BIBLIOGRAFIA	119

En primer lugar deseo agradecer la colaboración del personal del Instituto Jaime Ferrán de Microbiología del C.S.I.C., donde se ha realizado este trabajo, así como a su Director Dr. Gonzalo Sierra, por las facilidades dadas para la ejecución del mismo.

Así mismo quiero agradecer al Prof. Dr. J. R. Lacadena, Catedrático de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, que tan amablemente nos ha aconsejado y aceptado la ponencia de la Tesis.

Muy especialmente deseo dar las gracias a la Dra. Ramona Beltrá Martínez de Velasco, Investigador Científico y Jefe del Laboratorio de Tumores Vegetales, quien al dirigir esta Tesis ha hecho posible su realización.

Deseo expresar mi gratitud hacia Emi Liébana y Pili Marcilla por la ayuda prestada a lo largo de este trabajo, así como a Juan Carlos, de Fotografía, sin cuya ayuda nunca se hubiera acabado.

Agradezco sinceramente a los Profs. Dr. Marc Van Montagu y Dr. Jeff Schell su completa ayuda y colaboración en este trabajo, llevado a cabo en parte en los laboratorios que dirigen en la Rijksuniversiteit de Gante (Bélgica) y en el Max Planck Institut für Züchtungsforschung de Colonia (Alemania) a cuyo personal quiero agradecer su colaboración continua y desinteresada. De manera especial gracias a Ria, a Gilbert Engler,

VI

Jean Pierre Hernalsteens y Guido De Vos, así como a Conie, Ellen, Gisi y Wolfgang. Gracias también a Csaba Koncz por multitud de consejos.

No quiero terminar sin agradecer a Nino Villarroel y Lothar Willmitzer todo el trabajo que han realizado conmigo y la cantidad de tiempo y esfuerzo que me han dedicado.

Por último, gracias a Jesús y a Paco por su ayuda en todo momento, casi siempre el más insospechado.

INTRODUCCION

Existen diversas interacciones de bacterias con plantas caracterizadas por la formación de hiperplasias, variando éstas según la especie bacteriana que las causa. En todas ellas se ha determinado la participación de plásmidos bacterianos en procesos fundamentales para el establecimiento y mantenimiento de la relación entre la bacteria y la planta.

Bacterias del género Rhizobium originan la formación de abultamientos o nódulos al infectar raíces de plantas leguminosas, que engloban a los bacteroides de Rhizobium. Estos nódulos permiten mantener un microambiente favorable para el funcionamiento de las nitrogenasas, produciéndose así la fijación del N_2 atmosférico. En la organización de los nódulos intervienen determinantes genéticos, tanto de la planta como de la bacteria. Aunque los genes directamente implicados en la fijación del nitrógeno (Nif) se sitúan agrupados en el cromosoma bacteriano (90), otros genes que participan en funciones conexas, como los relacionados con la capacidad de nodular (Nod), o con el reciclaje del hidrógeno liberado por las nitrogenasas (Hup), pueden venir codificados en elementos extracromosómicos (10).

La tuberculosis del olivo, producida por Pseudomonas savastanoi, es una enfermedad muy extendida en la zona mediterránea, cuyos síntomas son la aparición de engrosamientos o tubérculos en las ramas jóvenes. Estos tubérculos parecen actuar como reservorios para proteger la bacteria de las condiciones adversas y favorecer nuevas infecciones en el siguiente ciclo anual (83). Parece ser que el desarrollo de los tubérculos es debido a la síntesis, por acción de la bacteria, de ácido indol 3-acético (AIA), (4), que provocaría el agrandamiento celular y el aumento de la tasa de multiplicación. La

síntesis de los enzimas que catalizan el paso de triptófano a indolacetamida, (triptófano 2 monooxigenasa), y de ésta a AIA, (indolacetamida hidrolasa), viene codificada, en las estirpes estudiadas, en un plásmido con un peso molecular de 34 megadaltons (Md), cuya eliminación convierte la bacteria en avirulenta (17).

La "escoba de bruja" es una enfermedad producida por Corynebacterium fascians, caracterizada por la pérdida de la dominancia apical, aparición de numerosas yemas y engrosamiento de los entrenudos; estos síntomas vienen originados por la acción de citokininas sintetizadas por la bacteria (80), habiéndose demostrado la relación entre la presencia de plásmidos y la virulencia de la estirpe.

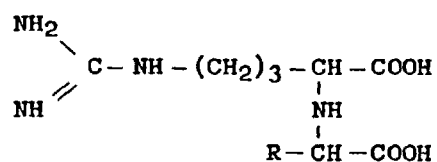
Varias especies del género Agrobacterium son patógenas para la mayoría de las Dicotiledoneas; así, A. tumefaciens es el causante del crown gall o agallas en corona, con aparición de hiperplasias de naturaleza tumoral; A. rhizogenes induce el hairy root, caracterizado por la proliferación de raíces en el punto de infección y A. rubi forma pequeñas proliferaciones en varios géneros de plantas (6).

A diferencia de los procesos causados por Rhizobium y Pseudomonas, Las hiperplasias inducidas por A. tumefaciens son debidas a una transformación tumoral de la célula vegetal. Las estirpes virulentas de A. tumefaciens son portadoras de un plásmido (Ti: tumor inducing), cuyo tamaño oscila entre los 95 y 156 Md (114), una parte del cual, denominada región T, se incorpora al genoma vegetal, donde se integra de una manera estable (14). La eliminación del plásmido, por medio de agentes intercalantes, como el bromuro de etidio (68), o cultivando la bacteria en temperaturas supraóptimas (40), con

duce a la pérdida de virulencia, siendo recuperada al reintroducir el plásmido.

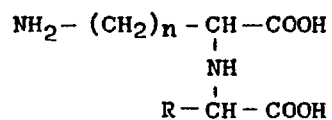
En la región T, además de los genes necesarios para la inducción y mantenimiento del estado tumoral, a parecen otros que dirigen la síntesis de nuevos compuestos no presentes en plantas sanas; además, la estirpe inductora del tumor es capaz de catabolizar estos compuestos, mediante la acción de enzimas codificados también en el plásmido Ti, utilizándolos como fuente única de carbono y/o nitrógeno (9). Por último, estos nuevos compuestos, denominados genericamente opinas (100), son también capaces de promover la conjugación del plásmido Ti (88) que normalmente no es transmisible, favoreciendo su difusión hacia otros Agrobacterium no portadores de plásmidos y por tanto avirulentos. De esta manera, la bacteria desvía, mediante la integración del T-DNA, las rutas metabólicas de la plantas hacia la formación de sustancias que solo ella puede catabolizar, creando así un microambiente favorable a las bacterias portadoras de plásmidos, ayudando a la diseminación de éstos, lo que posibilita nuevas infecciones. Todo este conjunto de sucesos constituye una nueva forma de parasitismo bacteriano que ha sido denominado colonización genética (92).

Un papel clave en el mantenimiento del sistema viene desempeñado por las opinas, cuya síntesis en la planta viene dirigida por DNA bacteriano. Se considera actualmente que existen tres grupos diferentes de opinas (57), viniendo determinado por el tipo de plásmido de la estirpe inductora el grupo que se va a sintetizar en el tumor. Así, las bacterias portadoras de un plásmido que origina la síntesis de una determinada clase de opinas, es capaz de utilizar esos mismos compuestos como fuente exclusiva de energía. Un primer gru



R = CH₃ Octopina

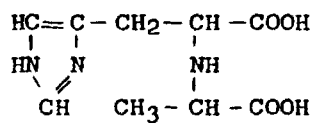
R = (CH₂)₂-COOH **Nopalina**



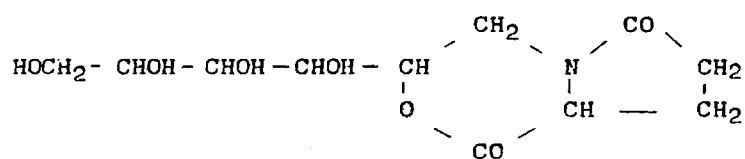
n = 3 R = CH₃ a. octopínico

n = 3 R = (CH₂)₂ COOH a. nopalínico

n = 4 R = CH₃ lisopina



Histopina



Agropina

po de opinas son sintetizadas por la acción de la lisopina dehidrogenasa (87) que condensa piruvato con un aminoácido básico: arginina para formar octopina (75), lisina para formar lisopina (70), histidina, apareciendo histopina (55) y ornitina, originando ácido octopínico (76). El segundo grupo de opinas es debido a la acción de la nopalina sintetasa (56) que condensa alfa cetoglutarato con arginina formando nopalina (38) o con ornitina formando el ácido nopalínico (33, 97). El tercer grupo presenta un único compuesto denominado agropina (34), que también aparece en los tumores formados por estirpes tipo octopina. Su ruta biosintética no está todavía dilucidada, si bien se apunta la posibilidad de una condensación de una aldohexosa con ácido glutámico (19) o algún derivado de éste.

Puede considerarse que Agrobacterium tumefaciens realiza naturalmente una manipulación genética de las plantas en su propio beneficio. La introducción en la célula vegetal de genes favorables para el hombre es un de los objetivos científicos prioritarios, basado en el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética. Se pueden considerar dos vectores candidatos actualmente para la introducción de tales genes en plantas: el plásmido Ti y el virus del mosaico de la coliflor (CaMV). La dotación genética de este último es una molécula de DNA bicatenario de 4.5-5.0 Md (49), que presenta tres zonas específicas de cadena simple (105) tras su aislamiento. Sin embargo, no se ha demostrado que este DNA se integre de manera estable en el genoma vegetal, por lo que su utilización para la implantación de nuevos genes sería muy problemática.

Una parte del plásmido Ti se integra en la célula vegetal (103, 112, 115) donde se transcribe (29) y tra-

duce (93, 94). Para su utilización en la introducción de nuevas secuencias de DNA en la planta se necesita saber más acerca de su emplazamiento, los procesos que influyen en su transcripción y cómo se produce ésta, así como cual es la acción que ejercen las proteínas por él sintetizadas, que conducen a la implantación y mantenimiento del estado tumoral. Un punto a estudiar son los sistemas alternativos a éste, que permitan una mayor comprensión de las funciones que provocan que una célula vegetal sana se convierta en una célula tumoral, perdiendo sus requerimientos de un aporte externo de fitohormonas (26, 27).

Debido al parentesco filogenético de A. rhizogenes con A. tumefaciens, el trabajo de la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio del hairy root, tratando de comprobar si en este caso la proliferación de raíces venía también ocasionada por una transformación celular, con una integración estable de DNA en las raíces tras la infección. Así, hemos buscado la presencia de plásmidos bacterianos en la estirpe estudiada y su relación con la virulencia. Se han comparado los plásmidos presentes en A. rhizogenes con plásmidos Ti de estirpes tipo de A. tumefaciens, buscando establecer sus homologías y se ha trabajado también en la detección de nuevos compuestos sintetizados en la raíz inducida por A. rhizogenes. Por último se ha buscado la posible presencia de secuencias de DNA bacteriano en el genoma de las células de las raíces inducidas, tratando de esclarecer los mecanismos que producen la proliferación radicular característica del hairy root.

La descripción de estas experiencias, junto con los resultados obtenidos y agrupados en el presente trabajo, constituyen la Tesis doctoral que presentamos y sometemos a juicio de este Tribunal.

MATERIALES Y METODOS

2.1 - MEDIOS DE CULTIVO.

Medio YEB

Extracto de carne	0.5 %
Levadura	0.1 %
peptona	0.5 %
sacarosa	0.5 %
MgSO ₄ (1M)	2 ml/l

Medio LB

Triptona	1.0 %
levadura	0.5 %
NaCl	1.0 %
glucosa	0.1 %

Medio PA

Peptona	0.4 %
MgSO ₄ (1M)	2 ml/l

Medio BDL

Levadura	0.1 %
----------	-------

lactosa	1.0 %
agar	2.0 %

Medio básico

CaSO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
NH ₄ NO ₃	2.7 g
Fe(NO ₃) ₃	5.0 mg
MnCl	0.1 mg
ZnCl ₂	0.5 mg
Citrato potásico	10.0 g
Glutamato sódico	2.0 g
NaH ₂ PO ₄	0.3 g
K ₂ HPO ₄	0.9 g
H ₂ O destilada	1 litro

Medio mínimo

K ₂ HPO ₄	5.25 g
KH ₂ PO ₄	2.25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
citrato sódico	0.25 g
MgSO ₄	1.25 mM
glucosa	0.2 %
H ₂ O destilada	500 ml

La glucosa se suprime cuando se utiliza

algun compuesto como fuente única de carbono.

Medio Linsmaier & Skoog (69).

Solución macronutrientes	40 ml
solución micronutrientes	1 ml
Na-Fe EDTA	5 ml
sacarosa	30 g
inositol	0.1g
tiamina (0.4 mg/ml)	1 ml
H ₂ O destilada	1 litro

- Solución macronutrientes

NH ₄ NO ₃	41.25 g
KNO ₃	47.50 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9.25 g
KH ₂ PO ₄	4.25 g
H ₂ O destilada	1 litro

- Solución micronutrientes

H ₃ BO ₃	6.2 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.6 g
KI	0.83 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 g
H ₂ O destilada	1 litro

- Na-Fe EDTA

FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57 g
Na ₂ EDTA	7.45 g
H ₂ O destilada	1 litro

El pH del medio se ajusta a 5.8. Para me
dio sólido se añade agar al 0.9 %.

Medio Murashige & Skoog (81).

Solución macronutrientes	10 ml
solución micronutrientes	1 ml
Fe EDTA	5 ml
sacarosa	30 g
adenina	1 g
inositol	100 mg
ácido nicotínico	0.5mg
piridoxina	0.5mg
tiamina	0.1mg
H ₂ O destilada	1 litro

- Solución macronutrientes

NH ₄ NO ₃	165 g
KNO ₃	190 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37 g
KH ₂ PO ₄	17 g
H ₂ O destilada	1 litro

- solución micronutrientes

H ₃ BO ₃	6.2	g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	g
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6	g
KI	0.83	g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	g
H ₂ O destilada	1	litro

- Fe EDTA

FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57	g
Na ₂ EDTA	7.45	g
H ₂ O destilada	1	litro

El pH del medio se ajusta a 5.8. Para me
dio sólido se añade agar al 0.9 %.

2.2 SOLUCIONES TAMPON

Buffer TE

TRIS (hidroximetilaminometano)	50 mM
Na ₂ EDTA (etilendiaminotetra- acetato disódico)	20 mM

λ buffer

TRIS	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Buffer TRIS-acetato (14).

TRIS	40 mM
Acetato sódico	20 mM
Na ₂ EDTA	2 mM

El pH se ajusta a 7.5 con ácido acético.

Buffer TRIS-borato (77).

TRIS	89 mM
ácido bórico	89 mM
Na ₂ EDTA	2.5 mM

El pH resultante es 8.4.

2.3 SOLUCIONES METODO BIRNBOIM

Solución lisozima

Lisozima	40 mg
sol. stock glucosa	1 ml
sol. stock EDTA	1 ml
sol. stock TRIS	1 ml
H ₂ O destilada	17 ml

Solución SDS alcalina

sol. stock NaOH	2 ml
sol. stock SDS	4 ml
H ₂ O destilada	34 ml

Solución ACS

3M Acetato sódico pH 4.8

El pH se ajusta con ácido acético. Se disuelve el acetato sódico en un volumen mínimo de agua y se añade después el ácido acético hasta alcanzar el pH, completando después el volumen con agua.

Soluciones stock

Glucosa	1 M
Na ₂ EDTA	0.2 M pH 8.0
TRIS	0.5 M pH 8.0
Dodecilsulfato sódico (SDS)	10 %
NaOH	4 N

2.4 SOLUCIONES METODO SOUTHERN

20x SSC

3M NaCl

0.3M citrato sódico

Solución de incubación

3x SSC

Polivinilpirrolidona (PVP)	0.2 %
Albúmina de suero bovina (BSA)	0.2 %
Ficol	0.2 %

Na₂EDTA 1 mM
DNA espermato salmón 100 µg/ml (10' a 100°, enfriar sobre hielo)

Soluciones de lavado

3x SSC 6 0.3x SSC
SDS 0.5 %
Na₂EDTA 1 mM

2.5 SOLUCIONES NICK TRANSLATION

Solución buffer de nucleótidos

dATP 100 µM
dGTP 100 µM
dTTP 100 µM

Los nucleótidos van disueltos en una solución buffer concentrada que contiene TRIS-HCl pH 7.8, MgCl₂ y 2-mercaptoetanol.

Solución enzimática

En cada alícuota de 10 µl van 5 unidades de DNA polimerasa I y 100 pg de DNAasa I en una solución buffer que contiene TRIS-HCl pH 7.5, MgCl₂, glicerol y BSA.

2.6 SOLUCIONES AISLAMIENTO RNA

Z2
50 mM MES

50 mM EDTA
5 % 2-mercaptoetanol
4M Tiocianato de guanidina
2 % Sarkosyl

El pH se ajusta a 7.0.

Z3

1 litro de 0.2 M EDTA pH 7.0
completar hasta 1.5 litros con agua destilada
disolver 1950 g de CsCl.
añadir antes de usar dietilpirocarbonato al 0.2 %.

Z5

2 volúmenes etanol
1 volumen H₂O destilada estéril
0.1 volumen 2M acetato sódico

El pH se ajusta a 5.0.

Z6

8M Guanidina-HCl
20mM MES
20mM EDTA
50mM 2-mercaptoetanol

El pH se ajusta a 7.0.

2.7 SOLUCIONES SINTESIS cDNA

A

dATP	10	mM	
dGTP	10	mM	
dTTP	10	mM	
dCTP	0.1	mM	esterilizar en autoclave

D

100 µg/ml oligo (dT)₁₀ en H₂O
esterilizar en autoclave

G

TRIS	10 mM	pH 8.0	
EDTA	1 mM		
SDS	0.5 %		

esterilizar en autoclave

H

0.5 mM dCTP

I

TRIS-HCl	500 mM	pH 8.0
Ditiotreitol	100 mM	
MgCl ₂	80 mM	

KCl 500 mM

esterilizar por filtración.

L

Urea 7 M

SDS 1 %

NaCl 0.3 M

EDTA 10 mM

TRIS 50 mM

Fenol/cloroformo/alcohol isoamfilico

Fenol 250 g

Cloroformo 240 ml

Alcohol isoamfilico 10 ml

2.8 BACTERIAS

- AgrobacteriumFENOTIPO

<u>A. tumefaciens</u> ACH5	Onc ⁺ Occ ⁺ Ocs ⁺ Agc ⁺ Ags ⁺ Agr ^r
<u>A. tumefaciens</u> C58	Onc ⁺ Noc ⁺ Nos ⁺ Agr ^s
<u>A. tumefaciens</u> C58C1	Onc ⁻ Noc ⁻ Nos ⁻ Agr ^r
<u>A. tumefaciens</u> C58C1 ery ^r cam ^r (pBo542)	Onc ⁺ Occ ⁺ Ocs ⁻ Agc ⁺ Ags ⁺
<u>A. radiobacter</u> K84	Onc ⁻ Agr ^r
<u>A. rhizogenes</u> 15834	Onc ⁺ (r) Agc ⁺ Ags ⁺ Agr ^r

Onc: virulencia, Occ: catabolismo de octopina, Ocs: síntesis de octopina, Agc: catabolismo de agropina, Ags: síntesis de agropina, Agr: sensibilidad a agrocina 84.

- Escherichia coli

J53 (RP4)

R 478

- clones pTiACH5 (28).

Los fragmentos de restricción del plásmido pTiACH5, digerido con HindIII o BamHI, vienen clonados en el plásmido pBR322. Las bacterias portadoras son E. coli C600 r_k⁻ m_k⁻.

<u>plásmido híbrido</u>	<u>nº fragmento BamHI</u>
PGV0110	1
PGV0120	2
PGV0131	3
PGV0140	5

<u>plásmido híbrido</u>	<u>nº fragmento BamHI</u>
PGVO153	8
	<u>nº fragmento HindIII</u>
PGVO201	1
PGVO203	19a, 22c, 27a, 28a, 29, 30b, 33b, 37a, 38a.
PGVO204	15c, 17, 19b, 21c, 21d, 23a, 27b, 34c, 37b, 39b.
PGVO205	6
PGVO206	7, 9a, 11, 21a, 22b, 39a.
PGVO207	5, 8, 13, 33a.
PGVO211	3, 26b, 30c, 31b, 34b, 37b, 39a.
PGVO219	14, 18c, 22e, 38c.
PGVO222	9b, 15a.
PGVO227	2, 25a.
PGVO239	7, 11, 12, 20.
PGVO290	9b, 15b, 18b, 19a, 24, 27a, 29, 30a, 30b, 32, 33b, 34a, 37a, 38a.

- clones pTic58

<u>plásmido híbrido</u>	<u>nº fragmento HindIII</u>
PGVO311	21a, 21b, 25a, 26b, 28, 29, 36, 37b, 38a.
PGVO321	1
PGVO335	7, 10, 16, 37a.
PGVO340	14a, 16, 18, 27.
PGVO347	3, 11, 31a, 38, 38.
PGVO348	9, 12, 17, 18, 34, 38, 39.

<u>plásmido híbrido</u>	<u>nº fragmento HindIII</u>
pGV0362	6, 20, 24, 28, 30b, 37b, 40, 42.
pGV0370	4, 21b, 29, 38a.
pGV0371	2, 8, 26a, 30b, 33, 35, 43.
pGV0415	22, 23, 31b, 33, 41.
pGV0726	5, 25b, 32.
82	15
83	19
327	14b
396	10
421	31b
422	23
423	22
425	41

Los fragmentos de restricción del plásmido pTiC58, digerido con HindIII vienen clonados en el plásmido pBR322 o pRSF2124. Las bacterias portadoras son E. coli C600 $r_k^- m_k^-$.

Las bacterias del género Agrobacterium son mantenidas habitualmente en medio YEB solidificado con agar al 1.5 %, mientras que las estirpes de E. coli lo son en medio LB sólido. Para su conservación durante largos periodos de tiempo se preparan viales de las bacterias en medio líquido con glicerol al 50 % y se guardan a -70°C.

2.9 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

La virulencia de las distintas estirpes de Agrobacterium fue comprobada inoculando discos de zanahoria o patata; éstos son esterilizados superficialmente sumergiéndolos durante $\frac{1}{2}$ hora en una solución de hipoclorito sódico al 10 % y SDS al 1 %. Las partes exteriores son desechadas y la parte central se corta en trozos que se disponen sobre un soporte de agar-agua al 1 % en placas petri, siendo entonces inoculados con 0.1 ml de un cultivo bacteriano crecido 24 horas en medio YEB líquido. Las placas se cierran con parafilm y son incubadas a 23°C en oscuridad, apareciendo los síntomas aproximadamente dos semanas después de la inoculación.

2.10 SENSIBILIDAD A AGROCINA 84

La agrocina 84 es una bacteriocidina producida por la estirpe K84 de A. radiobacter (91). Su actuación sobre los distintos Agrobacterium fue comprobada según el método descrito por Stonier (96): se prepara un cultivo de A. radiobacter K84 en medio básico, dejándolo crecer durante 24 horas. Un mililitro de este cultivo se añade a tubos que contienen 2 ml de medio básico con agar al 0.9 % fundido. Antes de que solidifique se reparte el contenido en gotas de unos 0.5 ml en el centro de placas petri con medio básico y agar al 1 %. Las placas se incuban durante tres días a temperatura ambiente.

Paralelamente se preparan los cultivos de las bacterias a probar. Se dejan crecer en medio básico a temperatura ambiente, sin agitación, durante los mismos tres días.

Pasados éstos, la bacteria productora de a

grocina 84 es eliminada, colocando papeles de filtro impregnados en cloroformo en la tapa interior de la placa petri. La operación se repite dos veces, dejando evaporar completamente el cloroformo. Las placas así preparadas son inoculadas con las bacterias a probar. En tubos con 2.5 ml de tampón fosfato sódico 0.2M pH 7.6 con 0.7 % de agar, previamente fundido, se añaden 0.5 ml de los cultivos bacterianos, poco antes de que el agar solidifique. El contenido de los tubos se extiende sobre las placas petri con agrocina 84. Las placas se incuban 48 horas a temperatura ambiente, apareciendo en el caso de las estirpes sensibles, un halo de inhibición en el centro de la placa, donde sin embargo aparecen algunas colonias resistentes.

2.11 PRODUCCION DE CETOLACTOSA

Siguiendo el método descrito por Bernaerts y De Ley (7), se cultivan las estirpes de Agrobacterium en medio BDL que contiene lactosa al 1 %, solidificado con agar.

El cultivo se realiza normalmente en un tubo con el agar inclinado. Tras incubar a 27°C durante 48 horas, se añade una pequeña cantidad del reactivo de Benedict ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 17.3 g/l, citrato sódico 173 g/l, carbonato sódico 100 g/l) (5), manteniendo los tubos a temperatura ambiente. En aquellos que se ha formado 3-cetolactosa, a partir de la lactosa existente en el medio, aparece coloración amarilla intensa debida a la formación de óxido cuproso.

2.12 CATABOLISMO DE OPINAS

La capacidad para utilizar octopina o nopalina como fuente de energía de la estirpe 15834 de A. rhizogenes fue estudiada inoculando una dilución apropiada de un cultivo bacteriano sobre placas con medio mínimo solidificado con agar al 1.5 %, que contenía octopina (50 µg/ml) o nopalina (10 µg/ml) como único aporte de nitrógeno. Las bacterias capaces de utilizar la opina forman colonias blancas que se distinguen fácilmente de las translúcidas, formadas por las bacterias que no son capaces de catabolizarla y cuyo crecimiento es debido a la utilización de sustancias presentes en el agar.

Alternativamente, la utilización de octopina o nopalina fue determinada midiendo su desaparición del medio de cultivo (71). 25 ml de medio mínimo conteniendo octopina o nopalina como única fuente de nitrógeno fueron inoculados con A. rhizogenes 15834 e incubados a 27°C y 200 rpm, midiendo la densidad óptica de la muestra a 600nm en un Spectronic Bausch & Lomb modelo 20. La concentración de las opinas es determinada a diferentes tiempos; se toma 1 ml de cultivo y se centrifuga para eliminar las bacterias; al sobrenadante se le añade 1 ml de una solución 0.9 N de NaOH, se mezcla y se añade 1 ml del reactivo 1-naftol diacetilo (3 % 1-naftol, 0.015 % diacetilo en n-propanol al 60 %). Se deja 30 minutos a temperatura ambiente para que el color rojo se desarrolle y se mide la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

2.13 CULTIVO DE TEJIDOS

Las raíces aparecidas tras la inoculación de A. rhizogenes 15834 en patata o zanahoria, son cortadas y colocadas en placas petri con medio Murashige & Skoog (81) o Linsmaier & Skoog (69), indistintamente; solidificado con agar al 1 %, conteniendo carbenicilina (Pyopen, Beecham R.L.) a una concentración de 1 mg/ml para impedir el crecimiento bacteriano. Las placas se incuban a 23°C en oscuridad y las raíces son replantadas cada mes, presentando algunas, al cabo de unos seis meses, un crecimiento vigoroso. Estas son utilizadas para preparar cultivos líquidos, en matraces de 500 ml con 250 ml de medio Linsmaier & Skoog, que se incuban a 23°C en oscuridad y con agitación (100 rpm). Las raíces desarrollan allí como tejido diferenciado, siendo replantadas cada tres semanas.

2.14 DETECCION DE OPINAS

2.14.1 Detección de agropina.

10-20 mg de tejido en cultivo o inoculado recientemente se maceran con una varilla de vidrio en un tubo eppendorf y se centrifuga para eliminar los residuos vegetales. Se toman 5 µl del sobrenadante y se someten a electroforesis de alto voltaje en papel Whatman 3MM durante ½ hora a 2000 V en buffer fórmico-acético a pH 1.8 (240 ml ácido acético glacial, 60 ml ácido fórmico y H₂O hasta 3 litros). Una vez seco, el electroforetograma se pasa rápidamente por una solución de AgNO₃ en acetona (2 g AgNO₃ en 20 ml H₂O y después se añade acetona hasta 1 litro). Se deja secar a temperatura ambiente y se pasa por el

reactivo alcalino (10 ml de 20 % NaOH y 90 ml de etanol al 96 %). Nada más aparecer las manchas, se fijan sumergiendo el papel en una solución que contiene 15 g de metabisulfito sódico y 100 g de tiosulfato sódico en 1 litro de agua. Las tiras de papel se lavan con agua del grifo y se dejan secar. Como control ponemos una mancha de verde de metilo (1 μ l de una solución 10 mg/ml).

2.14.2 Detección de octopina y nopalina

Para la detección de octopina se incuba el tejido en medio Murashige & Skoog con 0.1 M arginina durante 24 horas, o en Murashige & Skoog sólido con 5 mM arginina-HCl durante 14 días. La nopalina puede ser detectada sin incubar con arginina (1). Se maceran 50 mg de tejido en un tubo eppendorf con una varilla de vidrio y se centrifuga 2 minutos en un Beckman Minifuge. Se ponen muestras de 2 μ l en papel Whatman 3MM y se somete a electroforesis de alto voltaje, en buffer fórmico-acético pH 1.8 durante 1 hora a 20-40 V/cm. Se seca el papel con aire caliente y se pasa por la solución de tinción que se prepara mezclando volúmenes iguales de la solución A: fenantrenoquinona al 0.02 % en etanol al 96 % y B: NaOH al 10 % en etanol al 60 %. Se seca a temperatura ambiente y las manchas amarillas son visualizadas con luz ultravioleta (113).

2.15 PLASMIDOS

2.15.1 Determinación de la presencia de plásmidos, (12).

Partimos de 50 ml de un cultivo bacteriano crecido durante 24 horas en medio PA a 27°C y 200 rpm. Las bacterias se recogen por centrifugación (8000 rpm, 10 min.) y se lavan con una solución 1 M de NaCl, agitando fuertemente durante 30 minutos. Después de recogidas, se lavan las bacterias dos veces con buffer TE pH 8.0 y se resuspenden en buffer TE (0.5 ml por cada 100 mg de bacteria). Después se añaden por cada 0.5 ml de la suspensión, 9.5 ml de buffer de lisis (buffer TE con SDS al 1 %, pH 12.45), mezclándolo suavemente. Se incuba a 34°C durante 30 minutos y entonces se baja el pH hasta 8.5-9.0 con 0.6 ml de 2M TRIS-HCl pH 7.0, por cada 10 ml de lisado, agitando con una varilla suavemente hasta que la viscosidad desaparece. El lisado se ajusta entonces a 3 % de NaCl con una solución 5M y después de 30 minutos se añade un volumen igual de fenol saturado con una solución al 3 % de NaCl en buffer TE. Las dos fases se mezclan en un agitador magnético a 300 rpm durante 10 segundos, agitando otros 2 minutos más a 100 rpm. Las dos fases se separan por centrifugación (5000 rpm, 10 min., 4°C) y la fase acuosa se recoge con una pipeta invertida y se ajusta a 0.3 M de acetato sódico usando una solución 3M; se añaden dos volúmenes de etanol frío al 96 % y se guarda a -20°C durante la noche. El DNA precipita y es recogido centrifugando 30 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante se desecha y los restos de etanol se evaporan en vacío. El DNA se resuspende entonces en 100 µl de buffer TRIS-borato y se somete a electroforesis en gel de agarosa.

2.15.2 Aislamiento y purificación de plásmidos.

Se han utilizado diversos métodos para la purificación de DNA plasmídico, dependiendo del tamaño molecular de los plásmidos a aislar.

a) Método Birnboim (8): Se ha empleado en la purificación de los plásmidos híbridos contenidos en E. coli C600 r_K m_K. Se hace un precultivo de la bacteria en 5 ml de LB y se incuba durante la noche a 37°C y 200 rpm; 1 ml de este precultivo se usa para inocular 5 ml de LB suplementados con 200 µg/ml de carbenicilina (LBCb), dejándolo desarrollarse durante 3 horas en las mismas condiciones. Con 1 ml de este cultivo se inoculan 250 ml de LBCb, incubándolos durante 3½ horas hasta que el cultivo alcanza una densidad óptica a 600 nm comprendida entre 0.8 y 1.2. Entonces los plásmidos son amplificados añadiendo clo₂ ramfenicol (150-170 µg/ml), manteniéndolo toda la noche a 37°C y 200 rpm.

Después de esto, las bacterias se recogen por centrifugación (8000 rpm, 10 min.) y se resuspenden en 20 ml de solución de lisozima, dejándolo 30 minutos a 0°C. Las bacterias son posteriormente lisadas añadiendo 40 ml de solución SDS alcalina, que se deja actuar durante 5 minutos a 0°C, donde el DNA cromosomal se denatura selectivamente. El lisado se neutraliza con 30 ml de la solución ACS y el DNA cromosomal forma entonces un agregado insoluble. La alta concentración de acetato sódico ocasiona la precipitación de los complejos proteína-SDS (72), así como de RNAs de alto peso molecular (20).

Pasada una hora se centrifuga el lisado, (15000 rpm, 45 min.) y al sobrenadante se le añaden 45 ml de fenol saturado con buffer de diálisis (buffer TE pH 8.0, 10 veces

diluido). Las dos fases se separan al añadir 45 ml de cloroformo. Después de centrifugar (5000 rpm, 10', 0°C), la capa superior acuosa se recoge con una pipeta del revés y se añaden 2½ volúmenes de etanol 96 % frío. El DNA precipita a -20°C durante la noche y se recoge después por centrifugación a 8000 rpm durante 30 minutos, se disuelve en buffer TE pH 8.0 y el DNA plasmídico se purifica por ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

b) Método Currier y Nester (21): Se ha utilizado, con algunas variaciones, para aislar los plásmidos Ti. Partimos de 1 litro de cultivo bacteriano, crecido 48 horas en medio PA a 27°C y 150 rpm. Recogemos las bacterias por centrifugación y lavamos una vez con buffer TE. Se resuspenden entonces en 200 ml de buffer TE pH 8.0 con SDS al 1 % y pronasa B (Calbiochem) 500 µg/ml, a partir de una solución (10 mg/ml), preincubada 30 minutos a 37°C. Las bacterias se lisan tras una incubación de 30 a 60 minutos a 37°C y el DNA cromosomal se denatura por adición, gota a gota, de 1N NaOH, removiendo suavemente con una varilla, hasta que el pH llegue a 12.45. Una vez alcanzado y después de 15 minutos, la solución se neutraliza hasta un pH entre 8.5 y 9.0 con 2M TRIS-HCl pH 7.0, perdiendo la viscosidad. Hecho esto, el lisado se ajusta a 3 % de NaCl por medio de una solución 5M y se trata con un cuarto de su volumen de fenol saturado con NaCl al 3 % en buffer TE. Se separan las fases por centrifugación (5000 rpm, 10 min., 4°C), tomando la capa superior acuosa con una pipeta del revés, ajustándola posteriormente a una concentración 0.3M de acetato sódico y añadiendo 2 volúmenes de etanol al 96 %. El DNA, que precipita a -20°C tras un mínimo de 4 horas, es recogido por centrifugación y disuelto en 7 ml de buffer TE, para purificar el DNA plasmídico por ultracen

trifugación en gradiente de CsCl.

c) Método modificado: En el aislamiento de DNA plasmídico de A. rhizogenes 15834 partimos de 3 litros de cultivo bacteriano en medio PA, incubado durante 24 horas a 27° y 200 rpm. Una vez recogidas las bacterias por centrifugación, se resuspenden en 50 ml de buffer TE pH 8.0 con 2 mg/ml de lisozima (Merck) y se incuba a 37°C durante 30 minutos, pasados los cuales se añaden 100 ml de buffer TE con 750 µg/ml de pronasa B (preincubada 30 min. a 37°C), se mezcla cuidadosamente y se deja otros 30 minutos a 37°. La lisis se obtiene al añadir esta suspensión suavemente a 800 ml de buffer TE pH 12.45 con SDS al 1 %. Aparece un lisado claro tras 15-20 minutos de incubación a 37°. La solución se neutraliza a pH 8.5-9.0 con 2M TRIS-HCl pH 7.0, desapareciendo entonces la viscosidad. La concentración de NaCl se eleva entonces hasta 1 M con una solución 5M y el DNA cromosomal y los complejos proteína-SDS precipitan a las 4-5 horas a 0°C y son eliminados centrifugando (8000 rpm, 30 min.). Al sobrenadante se le añade polietilenglicol 6000 (PEG) hasta una concentración del 10 % con una solución al 50 % y el DNA precipita a 4°C durante la noche. Al día siguiente, tras recoger el DNA por centrifugación (8000 rpm, 30 min.) se disuelve en buffer TE pH 8.0, y se separa el DNA plasmídico de los restos de DNA cromosómico y RNA de bajo peso molecular por ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

d) Ultracentrifugación al equilibrio de densidades en gradientes de CsCl con bromuro de etidio: Para separar el DNA plasmídico de los restos de DNA cromosomal y RNAs con taminantes, se disuelve el precipitado, obtenido tras los aisla-

mientos descritos anteriormente, en un volumen adecuado de buffer TE pH 8.0. Para preparaciones pequeñas (partiendo de un litro de cultivo o menos) se añaden 7 ml de buffer y tras disolver el DNA, se disuelven 7.2 g de CsCl y 400 µl de una solución 10 mg/ml de bromuro de etidio en buffer TE. Para preparaciones mayores se disuelve el DNA en un volumen pequeño de buffer y se añaden después 29.6 g de CsCl y 2 ml de la solución de bromuro de etidio, completando hasta un volumen final de 38 ml con buffer TE. El gradiente se forma tras centrifugar 20 horas a 40000 rpm, en rotores verticales Beckman, VTi65 para las muestras pequeñas y VTi50 para las grandes. El RNA queda en el fondo del tubo y las bandas de DNA cromosomal y DNA plasmídico son visibles con luz ultravioleta; la banda inferior, plásmido, se recoge con una jeringuilla. El bromuro de etidio se elimina mediante 5-6 extracciones con alcohol isopropílico saturado con buffer TE y CsCl y la muestra es dializada 24 horas, cambiando dos veces el buffer de diálisis.

2.15.3 Caracterización de plásmidos

a) Microscopía electrónica (64): Una vez purificada por ultracentrifugación, la banda de DNA plasmídico se recoge en tubos de nitrocelulosa y se irradia durante 4 horas con una lámpara de 100 W a 20 cm de distancia; de esta manera el DNA circular cerrado covalentemente pasa a la forma circular abierta. El bromuro de etidio se extrae con alcohol isopropílico saturado y se dializa como anteriormente. Se toma un volumen de muestra que contenga entre 0.1 y 0.01 µg de DNA para preparar la hiperfase, según el orden:

x μ l H₂O bidestilada (para completar un volumen final de 60 μ l).

10 μ l Acetato amónico 6M

10 μ l Buffer (5×10^{-2} M TRIS-HCl; 5×10^{-3} M EDTA pH 8.5)

y μ l Solución de DNA

10 μ l Citocromo c (Sigma), solución 2 mg/ml

Como hipofase se usa una solución 0.25 M de acetato amónico. Con un capilar se deslizan dos gotas por un porta para hacer la extensión sobre la hipofase, en una placa petri. La muestra se localiza haciendo flotar polvos de talco en la unión del porta con la hipofase, que después sirven para marcar el borde de la extensión. Se toman dos rejillas cada vez. Las rejillas (200 mallas) llevan una película de colodión vaporizada con carbón para darle rigidez. Después de tocar la superficie de la extensión, se sumerge la rejilla durante 10 segundos en una solución 5×10^{-5} M de acetato de uranilo en etanol al 90 % y se lavan sumergiéndolas 2 ó 3 veces en etanol al 90 %; una vez secas, se sombrean en vacío con platino-paladio en un vaporizador, haciendo que el soporte gire con un ángulo de 8°, vaporizando después una fina capa de carbón, y se observan con el microscopio electrónico de transmisión. Se toman fotografías a 4000 aumentos y los aumentos reales en los positivos se determinan mediante una rejilla de réplica (Fullam 2160 líneas/mm). La longitud de los plásmidos se mide sobre las fotografías usando un calculador electrónico de gráficas (Numonics Corp.) y el peso molecular se determina usando el factor de conversión 2.07 Md/ μ m, correspondiente a estas condiciones (31).

b) Digestión del DNA con enzimas de restricción: Las condiciones de digestión de los diferentes enzimas de restricción utilizados (Bethesda Research Laboratories) han sido las siguientes:

Buffer incubación

BamHI	20 mM TRIS-HCl pH 7.0 100 mM NaCl 7 mM MgCl ₂ 2 mM 2-mercaptoetanol
EcoRI	100 mM TRIS-HCl pH 7.2 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 2 mM 2-mercaptoetanol
HindIII	20 mM TRIS-HCl pH 7.4 60 mM NaCl 7 mM MgCl ₂
Hpa I	20 mM TRIS-HCl pH 7.4 20 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM ditiotretitol
Kpn I	6 mM TRIS-HCl pH 7.5 6 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM 2-mercaptoetanol
Pst I	20 mM TRIS-HCl pH 7.5

10 mM $MgCl_2$
 50 mM $(NH_4)_2SO_4$
 100 $\mu g/ml$ BSA

SmaI 15 mM TRIS-HCl pH 8.0
 6 mM $MgCl_2$
 15 mM KCl

La temperatura de incubación es de 37°C en todos los casos. La reacción se efectúa en un espacio de tiempo y con concentraciones de enzima suficientes para que la digestión sea completa.

El buffer de incubación se prepara en soluciones stock 10 veces concentradas. El volumen de la mezcla se completa con H_2O destilada. Cuando los fragmentos de restricción van a ser separados por electroforesis en gel de agarosa, la reacción se detiene añadiendo 1/4 de volumen de una solución:

20 % Ficol
 0.2 % SDS
 0.05 % azul de bromofenol

Alternativamente, la reacción se puede detener calentando la mezcla 10 min. a 70°C o añadiendo una solución de EDTA suficiente para bloquear los iones Mg^{2+} presentes en la mezcla de reacción.

c) Electroforesis en geles de agarosa: Se han utilizado únicamente geles horizontales de agarosa. Para detectar la presencia de plásmidos en una estirpe y determinar su peso molecular se emplean geles de agarosa al 0.7 % en buffer

TRIS-borato (77). La electroforesis se lleva a cabo igualmente en buffer TRIS-borato a 150 V durante 4-5 horas o a 100 V durante la noche, siempre en cámara fría, para que el gel no se caliente. El DNA se tiñe sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio (0.4 µg/ml en H₂O) y se visualiza sobre un transiluminador con luz ultravioleta (Ultraviolet Products, San Gabriel, Cal.) al cabo de una hora, tomando fotografías con una Polaroid Land Camera. Como standard de peso molecular se usan los plásmidos RP4 (36Md) (51), R478 (166 Md) (41) y ACH5 (132 Md) (28).

Para separar los fragmentos de restricción se utilizan geles de agarosa al 0.8 % en buffer TRIS-acetato con 0.4 µg/ml de bromuro de etidio, usando el mismo buffer para la electroforesis, que se realiza a 40 v durante toda la noche, hasta que la banda azul de bromofenol alcance más o menos las 3/4 partes de la longitud del gel. Los fragmentos de restricción son visibles con luz ultravioleta y se toman fotografías con la cámara Polaroid. Como standard se utiliza DNA de fago lambda (Bethesda Research Laboratories) cortado con HindIII (82) o Pst I (13), cuya digestión origina fragmentos de tamaño conocido.

2.16 HOMOLOGIAS ENTRE PLASMIDOS

Las homologías entre los diferentes plásmidos, su grado y su distribución, se han establecido por hibridación entre sus DNAs, haciendo uso de las técnicas descritas por Southern (Southern "blotting") (95).

2.16.1 Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa:

Una vez separados los fragmentos de restricción por electroforesis y fotografiados, los geles se sumergen en la solución de denaturación (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) durante 30 minutos, pasándolos después a la solución de neutralización (3 M NaCl, 0.5 M TRIS-HCl pH 7.0) durante 20 minutos por dos veces. En todos los casos es conveniente mover suavemente el recipiente de vez en cuando para una mejor actuación de las soluciones. Después de esto, el gel se coloca sobre papel de filtro en contacto con un recipiente que contiene 20x SSC. En contacto con el gel ponemos el filtro de nitrocelulosa (Sartorius), previamente empapado en 3x SSC y encima de él papel Whatman 3MM, empapado también en SSC tres veces concentrado, para evitar que el filtro toque las toallas. Rodeando el gel se pone un material impermeable (film transparente de conservar alimentos o autorradiogramas desechados) para que el 20x SSC tenga que pasar necesariamente a través del gel.

Encima del papel Whatman colocamos toallas de papel, que absorben el 20x SSC, estableciendo un flujo a través del gel y del filtro de nitrocelulosa, y por último colocamos un peso sobre las toallas. La transferencia se completa durante la noche, pudiendo aumentarse la velocidad cambiando va-

rias veces las toallas empapadas. Una vez terminada la transferencia, el filtro se moja tres o cuatro veces en 3x SSC, pudiendo comprobarse que el DNA se ha transferido viéndolo con luz ultravioleta. Después de lavado, el filtro se calienta a 80° en vacío durante 4-6 horas, pudiendo ser guardado largo tiempo en vacío y oscuridad.

2.16.2 Preincubación de los filtros:

Para preparar los filtros, se recortan de tal manera que el volumen de incubación vaya a ser el mínimo posible. Se empapan en la solución de incubación (24, 53), se introducen en bolsas de polietileno con un volumen suficiente de la solución, evitando que se formen burbujas. Las bolsas se sellan por calor y se dejan a 70°C en un baño de agua con agitación suave. El tiempo de incubación varía, pero suele ser unas 16-20 horas el más conveniente.

2.16.3 Marcaje radiactivo del DNA

El DNA es marcado "in vitro" con ^{32}P por el procedimiento de "nick translation" (89), hasta una actividad aproximada de 2×10^8 cpm/ μg . Utilizamos 1-2 μg de DNA, a los que se añaden 20 μl de la solución buffer de nucleótidos, entre 625 y 1250 picomoles de (α ^{32}P) dCTP y 10 μl de la solución enzimática, completando el volumen hasta 100 μl con H_2O destilada. La reacción se efectúa en un tubo de polipropileno de 1.5 ml de capacidad (Eppendorf) a 15°C, durante 1½ a 2 horas, permitiendo que la DNAasa I produzca roturas en las cadenas de DNA, que son empleadas en la reacción catalizada por la DNA polimerasa I, que

elimina los nucleótidos existentes e incorpora los presentes en el medio, limitándose la extensión del reemplazamiento en esta temperatura a un recambio completo de la secuencia de nucleótidos existentes.

Realizada la reacción de "nick translation" se carga la muestra en una columna de 10 cm de longitud de Sephadex G 50, suspendido en un buffer que contiene 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS y 50 mM TRIS-HCl pH 7.5. Se colectan fracciones, eluyendo el DNA marcado en primer lugar, viniendo después los nucleótidos no incorporados. Las fracciones que contienen el DNA marcado se mezclan y se mide la actividad de 5 μ l de la muestra en un contador de centelleo.

2.16.4. Hibridaciones (109):

El DNA marcado radiactivamente se precipita con dos volúmenes de etanol a una concentración 0.3 M de acetato sódico. Tras centrifugar y desecar en vacío, el DNA se resuspende en un volumen adecuado de la solución de hibridación. Los filtros de nitrocelulosa, preincubados como anteriormente, se introducen en bolsas de polietileno, en el volumen mínimo que permita que todo el filtro permanezca constantemente empapado, añadiendo después el DNA marcado y cerrando la bolsa por calor, evitando en lo posible la formación de burbujas, que generalmente provocan la aparición de manchas inespecíficas en los autorradiogramas. Antes de ser añadida la solución con el DNA marcado, se calienta 5 minutos a 100°C para denaturar el DNA y se enfría inmediatamente sobre hielo. Una vez cerrada la bolsa, se recubre con otra más para evitar cualquier fuga de líquido y se pone a incubar en un baño de agua a 70°C, con agitación suave para ase-

gurar una distribución uniforme del DNA marcado, durante 48 horas, pasadas las cuales se lavan los filtros 3 ó 4 veces con la solución de lavado que contiene SDS, hasta que desaparece el ruido de fondo, midiendo con un contador de mano. Esto se hace en cajas de plástico a 70°C en baño con agitación; después se lavan otras dos veces con 1 mM EDTA en 3x ó 0.3x SSC, según los casos, y se secan $\frac{1}{2}$ hora en vacío a 80°C. Una vez secos, los filtros se exponen a películas Kodak X-R-Omat 5 en cassettes Kodak con pantallas de intensificación, de 1 a 5 días a -70°C.

2.17 HOMOLOGIAS RNA-DNA

2.17.1. Extracción de RNA:

Partimos de unos 40 g de raíces cultivadas en medio líquido, a los que se añade el mismo volumen de la solución Z6 y se homogeniza con ultraturrax, teniendo cuidado de mantener la temperatura baja; se suele hacer de 8 a 10 ráfagas de 10 segundos, en cámara fría. El homogeneizado se centrifuga 30 minutos a 4000 rpm y el sobrenadante se lleva al gradiente de CsCl. Este se hace en un rotor Beckman SW40 poniendo 3ml de solución Z3 en cada tubo y rellenándolos cuidadosamente con el sobrenadante obtenido, evitando que se mezclen. Se centrifuga a 35000 rpm durante 20 horas, tras lo cual el RNA precipita, mientras que el DNA queda en el sobrenadante. El precipitado de RNA se resuspende en 0.5-1.0 ml por tubo de solución Z2 y se centrifuga 10 minutos a 5000 rpm para eliminar el material no soluble. Al sobrenadante se añade 1/20 de volumen de ácido acético 1 M y precipitamos el RNA con 0.7 volúmenes de etanol 96 %, tras un

mínimo de 3-4 horas a -20°C . Se recoge por centrifugación (8000 rpm, 15 min.), se lava dos veces con solución Z5 y se disuelve en 100-500 μl de agua estéril. Se mide el espectro de absorción entre los 300 a 200 nm de la muestra, con un espectrofotómetro de barrido Perkin-Elmer & Co. y 20 μl se utilizan para una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0 (74). A los 20 μl de RNA se añaden 30 μl de dimetilsulfóxido (DMSO), 10 μl de glyoxal al 30 % y 6 μl del buffer de electroforesis 10 veces concentrado. Se deja una hora a 50°C y se añaden 10 μl de la solución de ficol 20 %, SDS 0.2 % y azul de bromofenol al 0.05 %. El gel se hace correr a 100 V de 2 a 3 horas y después se sumerge 1 hora en 50 mM NaOH con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de bromuro de etidio. El gel se lava durante 15 min. 2 veces con 0.2 M acetato sódico pH 4.3 y después se fotografía con luz ultravioleta.

2.17.2 Síntesis y aislamiento de cDNA (109)

Para sintetizar DNA complementario tomamos el RNA, aislado como se describió, en una solución acuosa de concentración 2-4 mg/ml y lo calentamos a 50°C durante 5 min.. En un tubo eppendorf estéril se ponen, en este orden, 20 μl de la solución A, 20 μl de la solución D, 20 μl de I, 100 μl de la solución de RNA y 10-20 μl de ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (10 mCi/ml). Se centrifuga unos segundos para juntar las soluciones y se deja 5 minutos en hielo. Después se añaden 15 μl de AMV (avian myeloblastosis virus) transcriptasa inversa (Dr. J. Beard, Life Sciences Inc., Florida) y se incuba a 37°C durante 90 min.. Tomamos 5 μl y le añadimos 100 μl de solución T2 (60 mM TRIS-HCl pH 7.9, 5 mM MgCl_2 , 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.1 mM EDTA, 15 % glicerina y

0.5 % BSA), precipitando con ácido tricloroacético (TCA) al 10% tras 30 min. en hielo, para comprobar la incorporación de radiactividad en cDNA. Al resto de la solución se le añaden 200 µl de 0.1 N NaOH y 20 µl de DNA de salmón (1 mg/ml), dejándolo incubar a temperatura ambiente durante la noche para hidrolizar el RNA. Al día siguiente se añaden 20-25 µl de 1 N HCl, comprobando que el pH quede entre 5 y 8, con papel de pH. Se añaden 300 µl de solución L y proteinasa K, incubando 30 min. a 37°C. La solución se trata entonces dos veces con fenol/cloroformo/isoamílico, tomando siempre la fase superior, que se carga finalmente en una columna de Sephadex G 50 (0.9 x 15 cm), colectando fracciones de 5 µl. Se mide la radiactividad que va saliendo por la columna, y las fracciones que contienen el primer pico (radiactividad incorporada en moléculas de alto peso) se agrupan, separando 5 µl para contar su actividad en un contador de centelleo.

2.17.3. Hibridación con cDNA (109).

Antes de la hibridación, el cDNA se denatura a 100°C durante 10 min. y se deja a 72°C. Se añade después el mismo volumen de 6x SSC con 0.2 % PVP, 0.2 % BSA, 0.2 % ficol, 1 mM EDTA, 100 µg/ml de DNA de salmón (denaturado 10 min. a 100°C) y 100 µg/ml tRNA, a la misma temperatura de 72°C. Los filtros se mantienen la noche anterior en solución de incubación con 100 µg/ml tRNA a 72°C en baño con agitación suave.

Para la hibridación se meten los filtros en bolsas de polietileno y se añade la solución con el cDNA marcado, cerrando las bolsas y procurando que no queden burbujas de aire. Se deja hibridar 40 horas a 72°C con agitación suave, y

después se lavan los filtros 3 veces con la solución de lavado con SDS y dos veces con 3x SSC. Los filtros se secan en vacío a 80°C durante $\frac{1}{2}$ hora y hacemos los autorradiogramas, manteniendo la exposición el tiempo necesario, a -70°C.

RESULTADOS

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria gram negativa, presente de manera habitual en el suelo, que origina, al introducirse en una herida de la planta, una enfermedad caracterizada por la aparición de una gran proliferación radicular y que se denomina hairy root. La estirpe utilizada en el trabajo ha sido la 15834, cedida por el Laboratorium voor Genetica de la Rijksuniversiteit de Gante (Bélgica); esta estirpe proviene en origen de la American Type Culture Collection (ATCC) y ha sido usada en la mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha. Por ésto, uno de los primeros puntos del trabajo ha sido comprobar las características descritas para ella.

Al comenzar el trabajo se planteó la caracterización de la estirpe en base a la presencia de algunos genes típicos de Agrobacterium, situados tanto en cromosoma como en plásmido, con especial atención a aquellos que vienen codificados en los plásmidos Ti de A. tumefaciens. Así, hemos estudiado la capacidad de A. rhizogenes 15834 de fermentar lactosa a 3-cetolactosa, viniendo este carácter codificado en el cromosoma bacteriano. La capacidad de producir 3-cetolactosa es un carácter típico de Agrobacterium. En las pruebas realizadas observamos que A. rhizogenes 15834 no es capaz de fermentar lactosa, (fotografía nº1), estando de acuerdo este resultado con lo descrito anteriormente (43). Como controles positivos utilizamos diversas estirpes de A. tumefaciens, siendo los controles nega-

Fotografía nº 1 : Prueba de fermentación de lactosa a 3-cetolactosa. A. rhizogenes 15834 no fermenta lactosa (tubo 1). Los controles negativos son P. savastanoi IF3001 (tubo 2) y R. leguminosarum 113 (tubo 3). Como controles positivos se usan diversas estirpes de A. tumefaciens (tubos 4 a 8).

47



A. rhizogenes 15834

P. savastanoi IF3001

R. leguminosarum 113

A. tumefaciens ATV

-AT7

-A04337

-ACH5

-C58C1

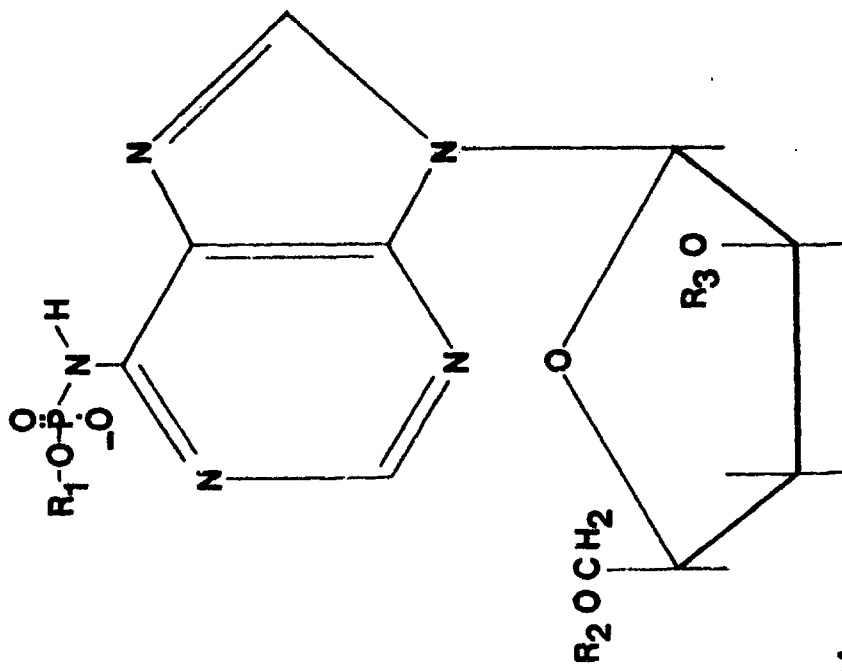
tivos la estirpe 113 de Rhizobium leguminosarum y la Pseudomonas savastanoi IF3001.

Otro caracter estudiado fue la sensibilidad de la estirpe a agrocina 84, bacteriocidina sintetizada por la estirpe K84 de A. radiobacter (84). Esta bacteriocidina es un 6-N-fosforamidato de un análogo del nucleótido de adenina (91), aun no caracterizado completamente, que inhibe el crecimiento de determinadas estirpes de A. tumefaciens. En la estirpe C58 la sensibilidad a agrocina 84 viene determinada por genes situados en el plásmido Ti (32); esta extraña situación de sensibilidad a un antibiótico debida a genes emplazados en factores extracromosómicos quedó aclarada con el descubrimiento de nuevas opinas cuyo catabolismo venía codificado en el pTiC58 y cuya estructura molecular era análoga a la de agrocina 84, pudiendo ser utilizados ambos sustratos en la reacción catabólica (30).

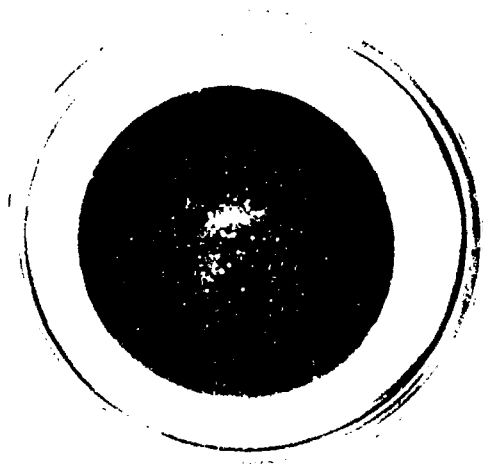
A. rhizogenes 15834 está citado como sensible a agrocina 84, siendo este caracter debido a la presencia de un plásmido con un peso molecular de 107 Md (106). En nuestro laboratorio se hizo el test de sensibilidad siguiendo el método descrito por Stonier (96), resultando la estirpe resistente en todas las pruebas realizadas. Como control positivo utilizamos la estirpe C58 de A. tumefaciens (fotografía nº2). Estos datos están en contradicción aparente con los resultados obtenidos en las hibridaciones, que demuestran la presencia en el plásmido de 15834 de secuencias homólogas a aquellas que codifican la sensibilidad a agrocina 84 en el pTiC58.

Un caracter investigado también fue la capacidad de la estirpe 15834 de utilizar octopina o nopalina como fuente de energía para su crecimiento. Inoculando 0.1 ml de una dilución adecuada (100-200 colonias por placa) sobre una

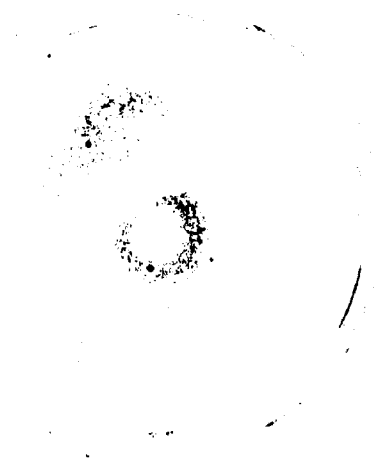
Fotografía nº 2 : Prueba de sensibilidad a agrocina 84. Esta bacteriocidina es un 6-N-fosforamidato de un análogo del nucleotido de adenina. A. rhizogenes 15834 es resistente a ella. Como control usamos A. tumefaciens C58, que forma un halo de inhibición. 31



Agrocina 84



A. tumefaciens
C38



A. ribisgemma
18324

placa de medio mínimo, suplementado con octopina o nopalina como fuente única de nitrógeno, se observa en ambos casos la aparición de colonias translúcidas, similares a las que produce la estirpe C58C1 de A. tumefaciens, utilizada como control negativo, y claramente diferentes a las colonias blancas que presenta la estirpe C58, que utiliza nopalina como aporte de nitrógeno, y que nos sirvió como control positivo en las placas con nopalina, o las formadas por la estirpe ACH5 en las placas con octopina. Sin embargo, en las placas suplementadas con octopina inoculadas con 15834, aparecen algunas colonias blancas, de notando la presencia de bacterias que utilizan octopina; este caracter se asocia (106) a un gen cromosómico constitutivo del biotipo 2 de Agrobacterium (78), diferente de aquel presente en los plásmidos Ti, que es inducible por el sustrato (61).

Cuando la utilización de opinas fue estudiada midiendo su desaparición del medio de cultivo, no se observa crecimiento en los cultivos de la estirpe 15834, tanto en el medio con nopalina como en el medio con octopina. La concentración de ambas varía paralelamente a una solución patrón sin inocular, lo que indica que la estirpe no las cataboliza. Los controles utilizados fueron también las estirpes C58 (nopalina) y ACH5 (octopina) de A. tumefaciens.

3.2. INOCULACIONES

La patogenicidad de la estirpe se probó rutinariamente en discos de zanahoria o de patata; tras inocularlos con una gota del cultivo bacteriano, se dejan las placas en oscuridad, apareciendo los primeros esbozos de raíz después de dos semanas de incubación a 23°C y desarrollándose completamente al mes y medio de la inoculación (fotografía nº3). Suelen aparecer también esbozos de tumor que no se desarrollan completamente. Las raíces tienen un aspecto idéntico a las que aparecen normalmente en plantas no infectadas.

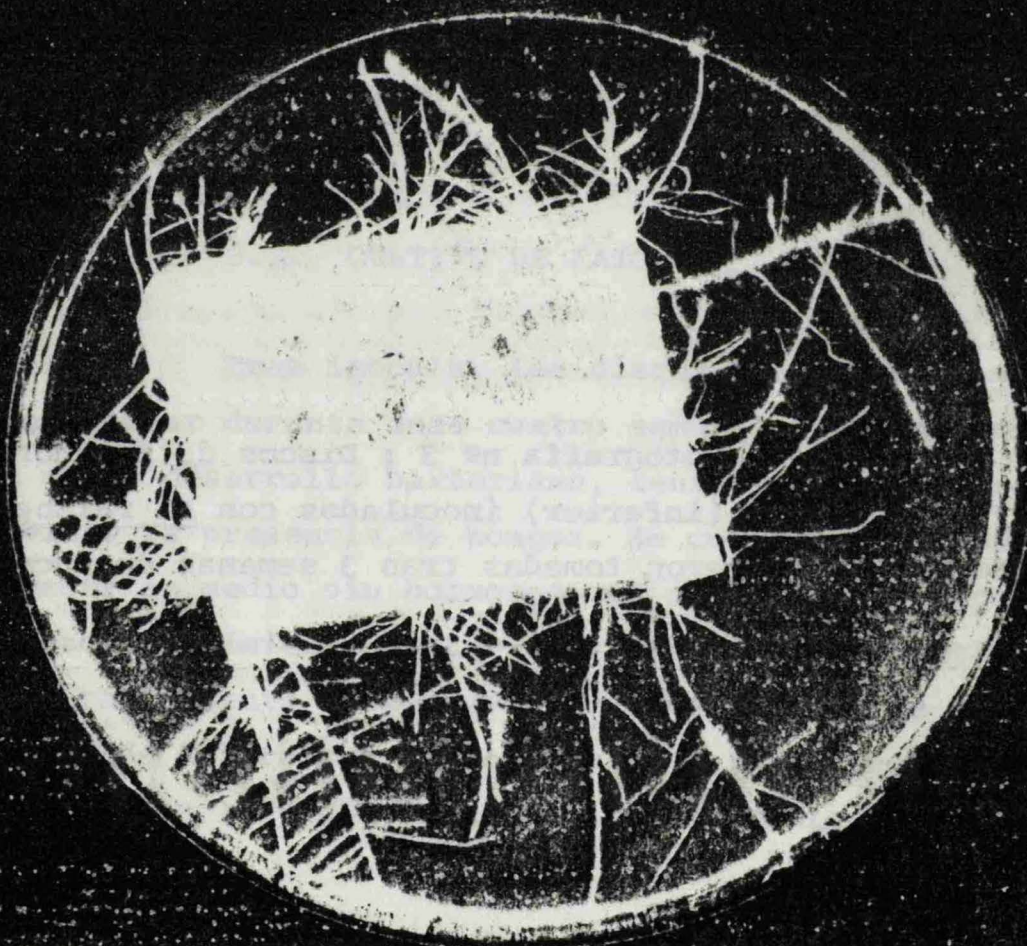
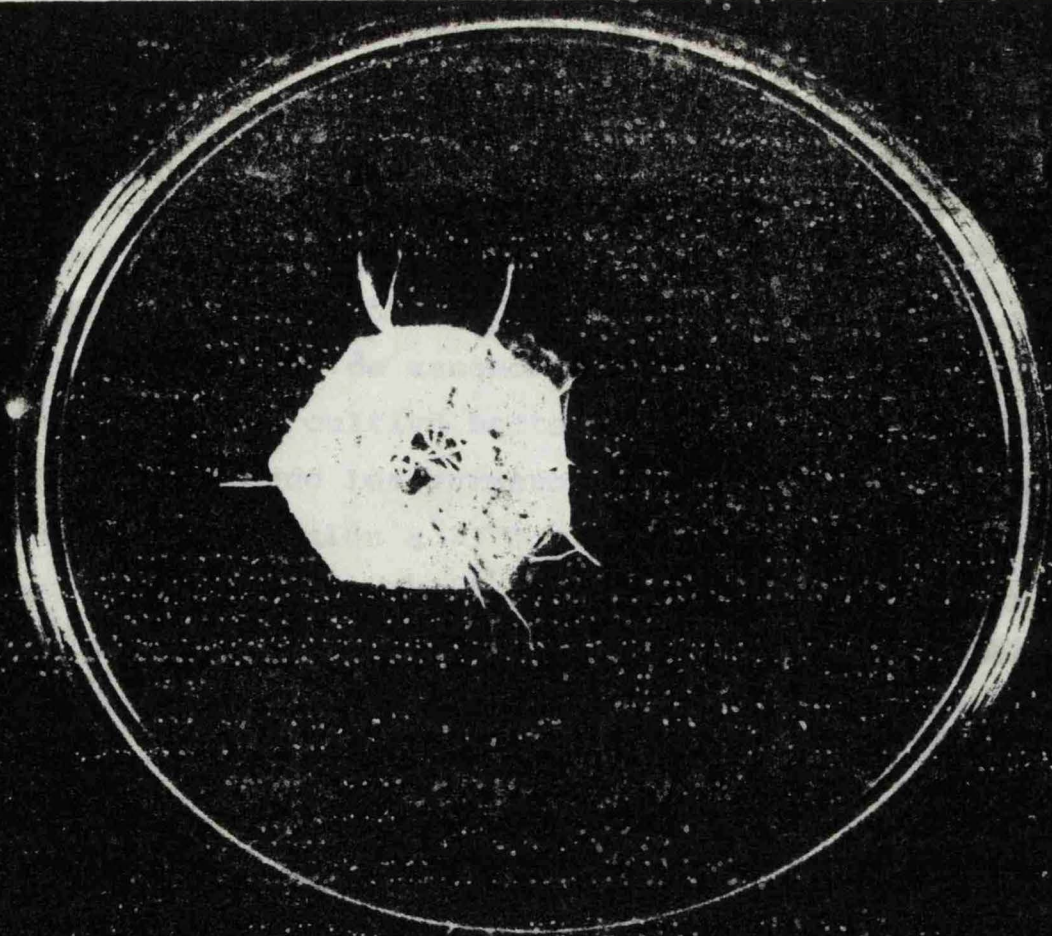
También se han inoculado plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), decapitando el ápice y depositando una gota de cultivo bacteriano. A las dos semanas comienza la formación de raíces, apareciendo también formaciones similares a los tumores del crown gall que, sin embargo, no se desarrollan al ser replantados en medio Murashige & Skoog sin hormonas.

3.3. CULTIVO DE RAICES

Tras inocular los discos de zanahoria y patata se dejan incubar durante unas cuatro semanas y se escogen las placas con menor desarrollo bacteriano, teniendo cuidado, sobre todo, en evitar la presencia de hongos. Se cortan las raíces y se hacen crecer en medio sin hormonas con antibiótico, vigilando que no aparezca crecimiento bacteriano. Las raíces de patata se habitúan más rápidamente al medio de cultivo que las de zanahoria; el crecimiento de las raíces se nota en el color blanco que presentan, así como en la proliferación de pelos radiculares. Estas

Fotografía nº 3 : Discos de zanahoria (superior) y de patata (inferior) inoculados con A. rhizogenes 15834.
Las fotografías fueror. tomadas tras 3 semanas de incubación.

»



que presentan el crecimiento más vigoroso son replantadas varias veces en placas con antibiótico. La esterilidad del tejido se comprueba, tras unos cuatro pases por placas con antibióticos, inoculando un macerado de raíz en un medio rico de cultivo, habitualmente YEB, no habiendo desarrollo bacteriano después de incubar varios días, tanto a 27°C como a 37°C. Estos cultivos estériles se pasan luego a medio Linsmaier & Skoog líquido, donde su crecimiento es mucho más rápido. A diferencia de lo que sucede en algunas líneas tumorales de crown gall, las raíces inducidas por A. rhizogenes 15834 siguen desarrollándose como tal tejido diferenciado, independientemente del tiempo que lleve establecido el cultivo, no formando suspensiones celulares.

3.4. PRESENCIA DE OPINAS EN RAICES INDUCIDAS POR A. RHIZOGENES 15834

La formación de compuestos de tipo opina en raíces inducidas por A. rhizogenes fue detectada por vez primera en un cultivo de raíces inducidas por la estirpe A4 en zanahoria (101). Utilizando un extracto acuoso de raíz y sometiéndolo a electroforesis de alto voltaje, detectaban dos compuestos no presentes en raíces de plantas sanas, que identificaron como agropina y manopina (98). Estas dos opinas fueron detectadas por primera vez en tumores inducidos por estirpes de tipo octopina, donde aparecían en cantidades que llegaban hasta el 7 % del peso seco del tumor (34). Posteriormente se descubrió su presencia en tumores formados por estirpes de tipo cero o "null type", en las que no se conocía la formación de ningún compuesto con esta actividad (39). La estructura de la agropina ha sido determinada (19)

y se postula su formación a partir de una aldohexosa (probablemente manosa) y ácido glutámico, cuya base de Schiff (manopina) se reduciría, ciclándose la molécula (agropina) (99). La concentración de agropina en las raíces inducidas por la estirpe A4 oscila entre el 0.5 y 3 % del peso seco del tejido.

Hemos investigado la presencia de estos compuestos en cultivos líquidos de raíces inducidas por Agrobacterium rhizogenes 15834 en patata. Tras la electroforesis en alto voltaje de un macerado de la raíz, se detectó la presencia de varios compuestos que reaccionaban con el AgNO_3 en medio alcalino. a pH 1.8, la mayoría de los azúcares no presentan ninguna movilidad, mientras que aparecen dos manchas que han migrado hacia el ánodo, una delante y otra detrás del marcador verde de metilo, que son respectivamente agropina y manopina. Aparece una tercera mancha, que ha migrado hacia el cátodo y que ha sido identificada como agrocínopina, compuesto de tipo opina formado por estirpes tipo nopalina de A. tumefaciens (30). Como controles utilizamos extractos de tumores formados por A. tumefaciens C58C1 $\text{ery}^r \text{ cam}^r$ (pBo542), que contienen agropina y manopina (39).

En ningún caso fue posible establecer la presencia de octopina o nopalina en las raíces inducidas por la estirpe 15834 de A. rhizogenes. Como controles utilizamos extractos de tumores inducidos por A. tumefaciens ACH5 (octopina) o C58 (nopalina).

3.5. PLASMIDOS EN AGROBACTERIUM RHIZOGENES

15834

La estirpe 15834 de A. rhizogenes ha sido descrita como portadora de tres plásmidos, de peso molecular 107, 154 y 258 Md, siendo este último un cointegrado de los otros dos. La virulencia viene codificada en el plásmido de 154 Md, mientras que la sensibilidad a agrocina 84 reside en el plásmido de 107 Md (106).

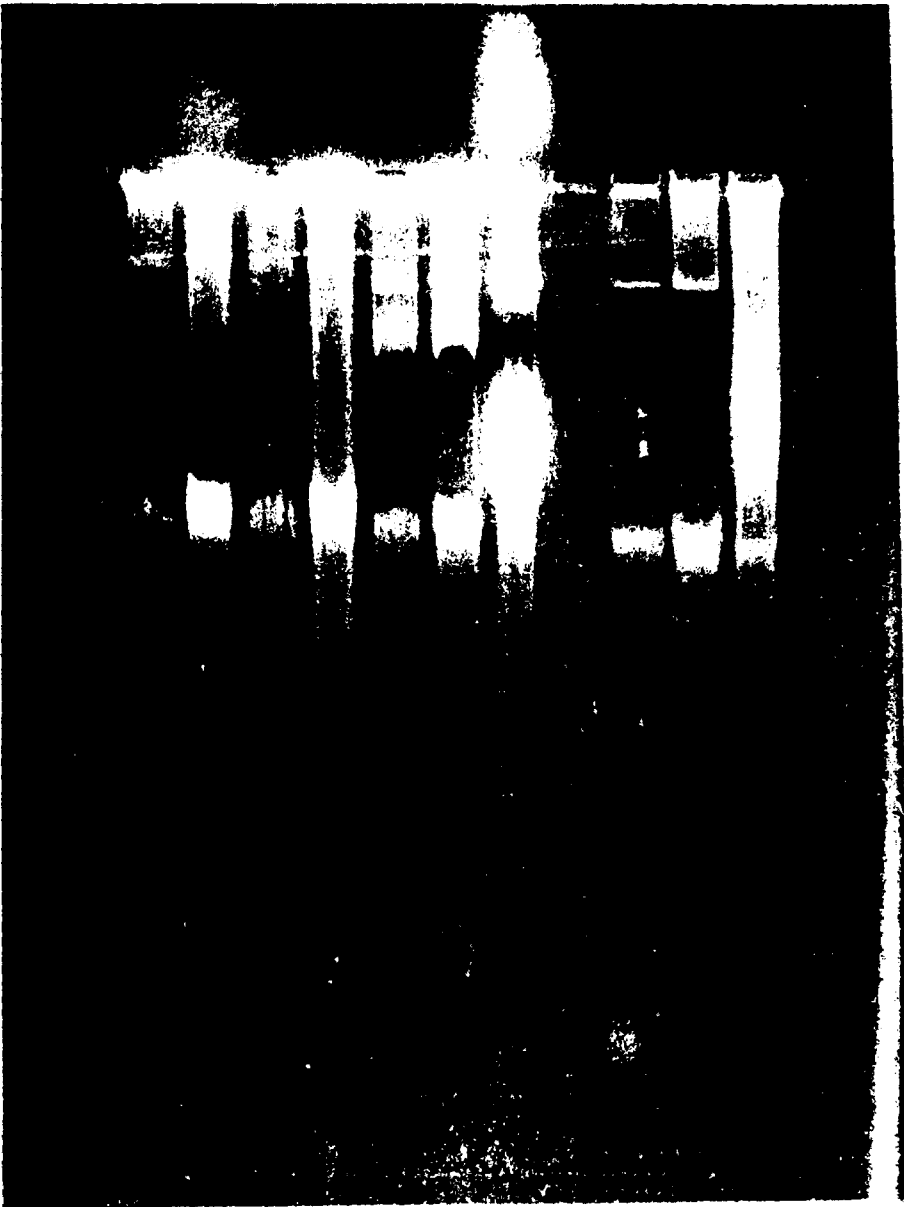
En orden a caracterizar la bacteria objeto de estudio, investigamos la presencia de plásmidos así como sus tamaños moleculares. Siguiendo el procedimiento descrito, hicimos varias lisis mini escala y, por electroforesis en gel de agarosa, logramos detectar la presencia de un plásmido, de un tamaño similar a los Ti de ACH5 y C58, inferior al plásmido críptico presente en A. tumefaciens C58C1, cuyo peso molecular es superior a 214 Md (12), (fotografía nº4). Este plásmido debe ser equivalente al pAr15834b (106), portador del carácter virulento de la bacteria, mientras que el pAr15834a, que codifica la sensibilidad a agrocina 84, parece no estar presente.

Según los métodos descritos, procedimos a purificar DNA del pRi15834 para su caracterización por microscopía electrónica y enzimas de restricción. Su aislamiento presenta gran dificultad siendo prácticamente imposible de obtener en cantidades apreciables siguiendo los métodos descritos para el aislamiento de los plásmidos Ti. Posiblemente el pRi15834 se rompe durante la fenolización; así, sustituimos este paso por una precipitación en 1 M NaCl, recogiendo el DNA tras precipitar en polietilenglicol al 10 %. De esta manera, partiendo de tres litros de cultivo bacteriano obteníamos, tras la purificación del DNA

Fotografía nº 4 : Determinación de la presencia de plásmidos en A. rhizogenes 15834. Los lisados bacterianos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron los plásmidos con luz ultravioleta. La estirpe 15834 es portadora de plásmidos (carriles 9, 10 y 11), de tamaño superior a los de A. tumefaciens C58 (carriles 5, 6 y 7) e inferior al plásmido críptico de A. tumefaciens C58C1 (carriles 1, 2 y 3).

59

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



plasmídico en gradiente de CsCl, una cantidad de DNA que habitualmente oscilaba entre 30 y 50 µg.

No ha sido posible su caracterización completa por microscopía electrónica; en los experimentos realizados se determinó la presencia de un plásmido de 109 Md, que sería equivalente al pAr15834a, (fotografía nº5), a diferencia del que se detecta por electroforesis en gel. En casi todas las muestras era posible ver fragmentos de lo que parecía ser un plásmido de gran tamaño, que sin embargo no fue posible fotografiar completo. (Tabla 1).

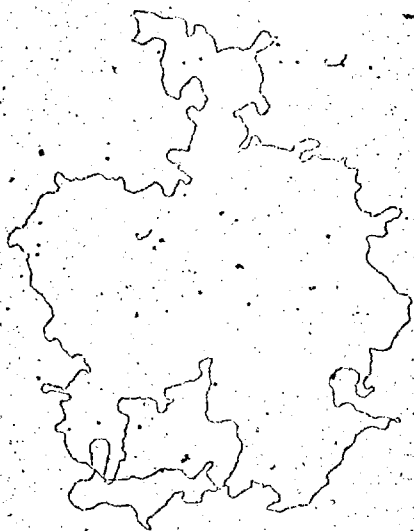
La caracterización por enzimas de restricción se ha hecho utilizando los siguientes enzimas: BamHI, HindIII, KpnI, Pst I y Sma I, que cortan el pRi15834 formando los pattern que aparecen en la fotografía nº5. A partir de la digestión con Sma I y comparando con DNA de fago lambda digerido con Pst I, que origina fragmentos de tamaño conocido (13), hemos determinado su peso molecular, que oscila alrededor de los 258 Md del pAr15834c, lo que coincide con la presencia, ya descrita, de dos plásmidos diferentes en nuestra bacteria.

<u>Negativo nº</u>	<u>Tamaño (µm)</u>	
16898	53.27	53.83
16970	54.65	54.59
16971	51.58	51.11
16972	52.90	52.53

TABLA nº 1: Longitud de los plásmidos determinada por microscopía electrónica. El aumento en los positivos fue determinado mediante una rejilla de replica.

FOTOGRAFIA nº 5: Parte superior: DNA plasmídico de A. rhizogenes 15834 (2µg/ carril) digerido con BamHI (nº 1), HindIII (2º), Kpn I (3º), Pst I (4º).

Parte inferior: Plásmido de A. rhizogenes 15834. Tamaño molecular 109 Md. Fotografía a 15000 aumentos.



3.6. HOMOLOGIAS ENTRE pRi15834 Y pTiC58

Para una primera hibridación utilizamos DNA plasmídico obtenido de un cultivo bacteriano de A. tumefaciens C58. Este pTiC58 fue purificado en un gradiente de CsCl y, tras extraer el bromuro de etidio y dializar la muestra, se digieren 2 µg de DNA con los enzimas BamHI, EcoRI, HindIII y Sma I. Los fragmentos de restricción se separaban por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % en buffer TRIS-acetato a 40 V durante la noche, siendo posteriormente transferidos a un filtro de nitrocelulosa según las técnicas del Southern "blotting". Después de preincubado el filtro, se hacían hibridar los fragmentos de restricción del pTiC58 con DNA de pRi15834 purificado y marcado con ³²P por "nick traslation", como se describe en Materiales y Métodos. Tras una incubación de 40 horas, los filtros se lavaban con una solución de lavado conteniendo 3x SSC, que se corresponde con una concentración de Na⁺ de 0.5 M. La estabilidad de los híbridos de DNA viene determinada por la concentración de sal en el medio. Dependiendo de las condiciones, la temperatura de fusión de los híbridos (T_m), aquella a la que la mitad del DNA se encuentra como doble cadena, varía según la relación:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \lg (\text{Na}^+) + 0.5 \% (\text{G+C}) + 0.6 \% \text{formamida. (11).}$$

Para unas condiciones de incubación, a temperatura inferior a T_m, las moléculas híbridas van a ser estables según su grado de homología, ya que un desapareamiento del 1 % en su secuencia de bases hace descender la T_m de la molécula en 1.4°C (50).

En las condiciones utilizadas, asumiendo un contenido de G+C del 59 % (107), la T_m era 106°C . A una temperatura de incubación de 70°C ($T_m - 36^{\circ}$) por lo tanto, van a ser estables aquellos heteroduplex que sean homólogos, por lo menos, en un 75 % de su secuencia de bases.

En esta primera hibridación se observaba, (fotografía nº6), la aparición de marcaje en varias bandas, de bido al apareamiento específico del DNA radiactivo, denotando u na relación entre los plásmidos. Sin embargo, este sistema no e ra muy útil para mapear las zonas de homología y así comprobar a qué regiones del pTiC58 correspondían. En cualquier caso, es ta hibridación sirvió para determinar la existencia de homolo-gía en algunos fragmentos, como el HindIII 13, no incluido en los clones existentes.

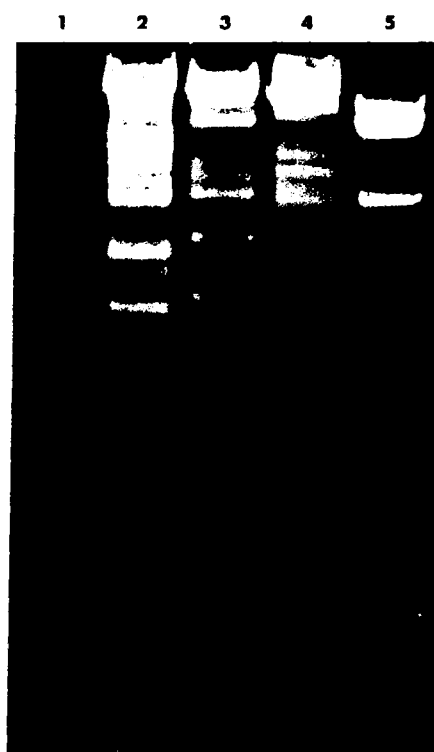
Para establecer el mapa de homologías utili zamos clones en pBR322 o pRSF2124 del pTiC58 que, al originar un menor número de fragmentos de restricción, permite una iden tificación más fácil de aquellos que hibridan; ésto es especial-mente notorio en los fragmentos que tienen la misma movilidad e lectroforética, que, en la mayoría de los casos, se incluyen en clones diferentes.

El aislamiento de los plásmidos híbridos se hizo según el método descrito por Birnboim (8). Partiendo de 250 ml de cultivo, amplificado con cloramfenicol, obtuvimos, para los diferentes clones, las siguientes cantidades de DNA:

<u>clón</u>	Absorción (nm)			<u>concentración (µg/ml)</u>
	<u>230</u>	<u>260</u>	<u>280</u>	
PGVO311	0.118	0.211	0.122	211
PGVO321	0.106	0.171	0.100	171

Fotografía n^o 6 : DNA de pTiC58 digerido con BamHI (2), EcoRI (3), HindIII (4) y Sma I (5). Los fragmentos de restricción son separados por electroforesis en gel de agarosa. Como control se utiliza DNA de fago lambda digerido con Pst I. (1). Los fragmentos son transferidos a un filtro de nitrocelulosa e hibridados con DNA de pRI15834 marcado radiactivamente (6, 7, 8 y 9). El clon pGVO321, conteniendo el fragmento HindIII 1 de pTiC58, es digerido con HindIII (11) y transferido a un filtro, siendo hibridado contra pRI15834 marcado (13). Como control utilizamos DNA de pRI15834 digerido con Sma I (10).

66



<u>clon</u>	<u>230</u>	<u>260</u>	<u>280</u>	<u>Concentración</u>
pGVO331	0.143	0.282	0.145	282
pGVO335	0.156	0.299	0.163	299
pGVO340	0.461	0.962	0.504	962
pGVO347	0.286	0.566	0.303	566
pGVO348	0.160	0.303	0.169	303
pGVO362	0.143	0.236	0.125	236
pGVO370	0.218	0.457	0.249	457
pGVO371	0.092	0.134	0.081	134
pGVO415	0.180	0.282	0.150	282
pGVO709	0.271	0.546	0.284	546

La dilución medida fue 1:20, en una cuveta de 400 μ l. El volumen total de muestra era 200 μ l en todos los casos. La concentración de DNA se mide según su absorbancia a una luz de longitud de onda de 260 nm, donde 50 μ g/ml de DNA tiene una absorbancia de 1.0. Las absorbancias a 230 y 280 nm nos dan una idea de la pureza del DNA (48).

2 μ g de DNA de cada clon, abarcando la totalidad del pTic58, fueron digeridos con HindIII y los fragmentos que se originaban fueron separados en un gel de agarosa al 0.8 % en TRIS-acetato pH 7.4. Como la longitud del gel necesaria para separar los fragmentos es menor en estos casos, un mismo gel se podía utilizar para separar dos digestiones a la vez.

El T-DNA del pTic58, que incluye la zona comprendida entre los fragmentos Hind III 10 y 23, se han clonado separando cada fragmento en un clon.

<u>clon</u>	<u>concentración (µg/ml)</u>
83	26
327	26
396	75
421	25
422	25
423	25
425	25
821	25

2 µg de DNA, digerido con HindIII, se sometían a electroforesis en gel aparte.

Los fragmentos de DNA separados así fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa, siguiendo las técnicas del Southern "blotting". Una vez preincubados los filtros, se hibridaron los fragmentos de restricción con DNA de pRi15834, marcado radiativamente con ^{32}P dCTP. La incubación se hacía a 70°C en una solución que contenía 3x SSC, durante 40 horas en baño de agua con agitación ligera. El lavado de los filtros se hacía a 70°C con soluciones conteniendo 3x ó 0.3x SSC. En el primer caso, lavando con 3x SSC, son estables aquellos híbridos que compartan una secuencia homóloga en un 75 % por lo menos. Al diluir 10 veces la concentración de Na^+ , lavando con 0.3x SSC, ($T_m = 90^\circ\text{C}$), los DNA híbridos para ser estables tienen que alcanzar, siguiendo la ecuación indicada anteriormente, una homología de por lo menos el 86 %. En los autorradiogramas obtenidos a partir de estos filtros se observa la presencia de algunas bandas que presentan marcaje radiactivo en los filtros lavados con 3x SSC, pero no así en los lavados con 0.3x SSC.

Estas corresponderían a zonas con homología media. Sin embargo, la mayoría de las zonas con homología a $T_m -36^{\circ}$, la siguen conservando a $T_m -20^{\circ}$, lo que parece indicar la presencia de zonas de secuencias prácticamente iguales entre los dos plásmidos, (fotografía nº7). Una vez situadas las zonas de homología en el mapa físico del plásmido Ti de A. tumefaciens C58 (25) (figura 2), se localizaron en el mapa genético establecido para el pTiC58 (45) (figura 3). De esta manera pudimos saber qué funciones genéticas del pTiC58 venían codificadas en las zonas de homología, funciones que, en muchos casos, podían estar presentes al mismo tiempo, en razón de su homología, en el plásmido Ri de A. rhizogenes 15834. El objeto era determinar la presencia de funciones o procesos homólogos entre la inducción, establecimiento y mantenimiento de la transformación tumoral de la célula vegetal en el crown gall y la aparición de raíces en el hairy root.

Así determinamos que no había en el pRi15834 ninguna región homóloga con el T-DNA del pTiC58, excepto en el fragmento HindIII 10, con un 75 % de homología (fotografía nº8); este fragmento pertenece al T-DNA y se transcribe activamente en la célula transformada pero, sin embargo, todavía no se le ha asignado ninguna función. No hay homología con la zona de síntesis de nopalina en la célula vegetal, ni con la zona que codifica el catabolismo de esta opina en A. tumefaciens C58.

Los fragmentos homólogos al pRi15834 se agrupan en el pTiC58 en una región continua, con excepción de los fragmentos HindIII 8 y 35. En las zonas de homología entre los dos plásmidos se sitúan, en el pTiC58, los genes que codifican las funciones implicadas en la transferencia del plásmido (genes Tra), que afectan a la conjugación entre bacterias y

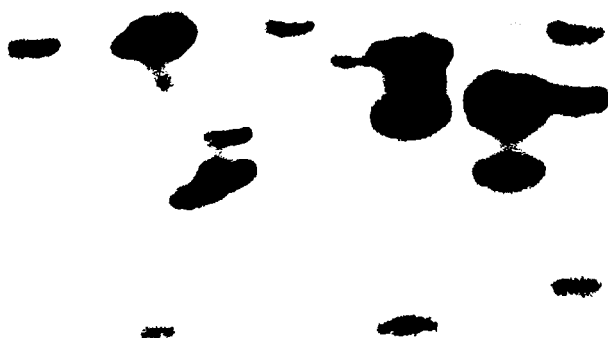
que pueden estar relacionados con la transferencia de DNA a la célula vegetal (100). Así mismo hay homología en la región que dirige la sensibilidad a agrocina 84 (Agr), aunque, como se dijo anteriormente, esta bacteria es resistente a la bacteriocina.

Todas las mutaciones que afectan a la virulencia de A. tumefaciens C58 (Onc⁻), que no pertenecen a la región T, mapean en regiones de homología con pRi15834. De la misma forma, estas regiones se encuentran situadas en las zonas de homología entre pTiC58 y pTiACH5, siendo también, por lo tanto, homólogas con el plásmido de A. rhizogenes 15834, excepto por la secuencia común (common DNA) de 5.5Md (102) presente en la región T de todos los plásmidos Ti estudiados.

Fotografía nº 7 : Clones de pTiC58 digeridos con HindIII y separados por electroforesis en gel de agarosa. los fragmentos son transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con DNA de pRi15834 marcado radiactivamente. Los filtros fueron lavados a 70°C con 3x SSC (75 % homología) o con 0.3x SSC (86 %). La exposición de los autorradiogramas era de 24 horas o 5 días. Se observa la desaparición en el filtro lavado con 0.3x SSC de algunas bandas presentes en el filtro lavado con 3x SSC.



3 X SSC 2



0.3 X SSC

Fotografía nº 8 : Fragmentos de restricción HindIII del T-DNA del pTiC58. Los fragmentos son separados en electroforesis en gel de agarosa, transferidos a un filtro de nitrocelulosa e hibridados con DNA de pRi15834 marcado radiactivamente. Solo aparece hibridación para el fragmento nº 10 en el filtro lavado con 3x SSC (75 % de homología)

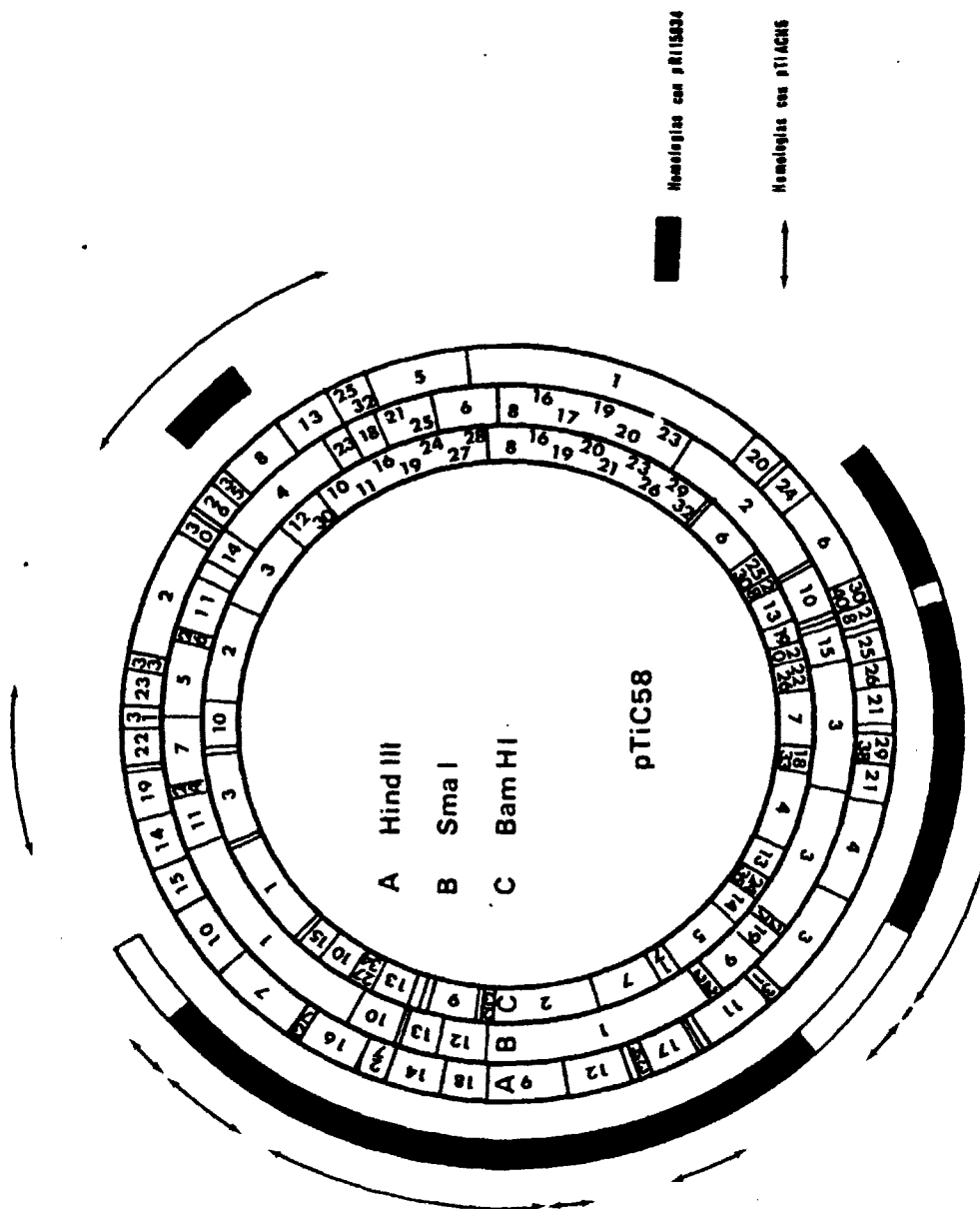
10 15 14 19 41 22 31 23

3X SSC 24h

0.3X SSC 5d

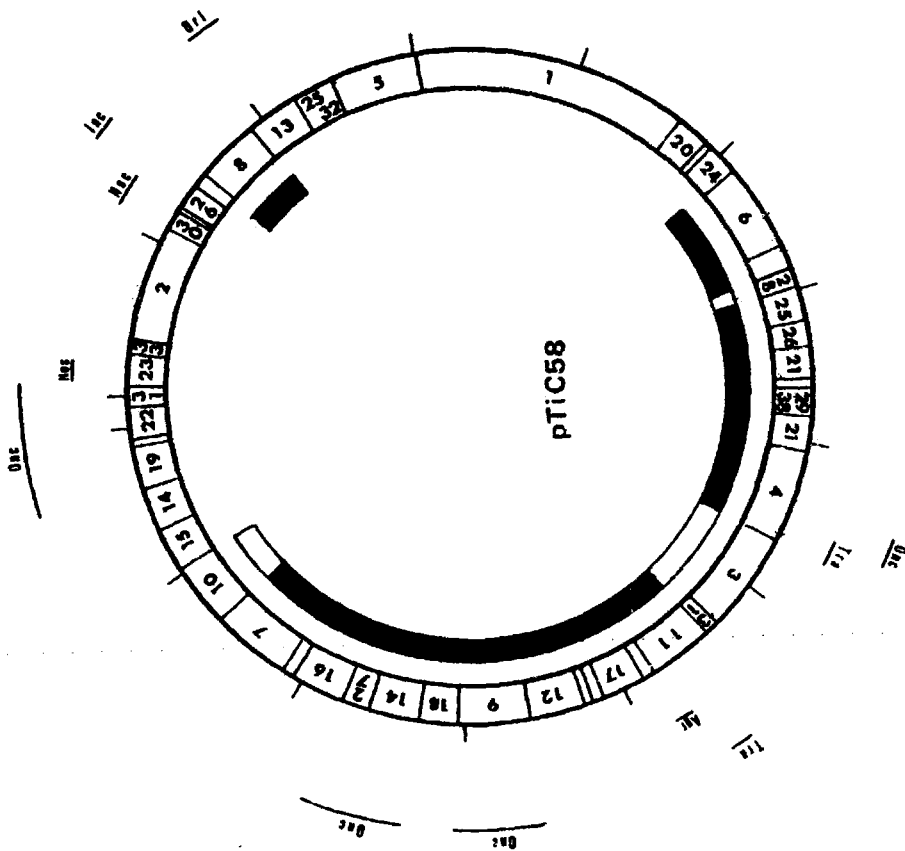
Figura nº 2 : Mapa físico de pTiC58 donde se señalan las zonas de homología con pRi15834 (en negro). Las zonas vacías representan homologías de un 75 %, frente al 86 % de las anteriores.

Figura nº 3 : Mapa genético de pTiC58 donde se determinan las funciones codificadas en las zonas de homología con pRi15834.



77

Memorandum for J115824



3.7. HOMOLOGIAS ENTRE pRi15834 y pTiACH5

En este caso utilizamos directamente para las hibridaciones los clones, en pBR322, del pTiACH5 (28). Los plásmidos híbridos se aislaron siguiendo el método de Birnboim (8), obteniendo, a partir de 250 ml de cultivo amplificado, las siguientes cantidades:

<u>clon</u>	<u>Absorción (nm)</u>			<u>concentración</u>
	<u>230</u>	<u>260</u>	<u>280</u>	
PGV0110	0.306	0.375	0.286	930 µg/ml
PGV0131	0.140	0.268	0.152	670
PGV0140	0.190	0.303	0.190	750
PGV0203	0.135	0.264	0.141	660
PGV0204	0.161	0.257	0.167	640
PGV0205	0.124	0.164	0.118	410
PGV0206	0.098	0.111	0.084	270
PGV0207	0.306	0.469	0.290	1170
PGV0211	0.154	0.216	0.154	540
PGV0219	0.261	0.388	0.267	970
PGV0222	0.150	0.297	0.158	740
PGV0227	0.080	0.155	0.108	380
PGV0239	0.127	0.192	0.144	480
PGV0290	0.217	0.270	0.232	670

Las medidas se obtuvieron a partir de diluciones 1:50 de la muestra. La cantidad total era 300 µl por cada muestra.

Se digerían 2 µg de cada clon con HindIII

y los fragmentos de restricción se separaban por electroforesis en geles de agarosa, siendo transferidos posteriormente a filtros de nitrocelulosa, como se ha descrito (95).

Tras preincubar los filtros, se hibridaban con DNA del plásmido de A. rhizogenes 15834, marcado con ^{32}P -dCTP por "nick translation"; la hibridación se hacía a 70°C con 3x SSC durante 40 horas; los filtros se lavaban a la misma temperatura con soluciones que contenían 3x ó 0.3x SSC, que hacía más restrictivas las condiciones de estabilidad para las moléculas híbridas formadas (T_m 106° y 90° respectivamente).

La homología entre el pRi15834 y el T-DNA del pTiACH5 fue estudiada en más detalle haciendo dobles digestiones de los plásmidos híbridos que contenían los fragmentos de restricción de este T-DNA, obteniendo así un mapa de homologías más fino, al ser menores los fragmentos de DNA analizados. Esto se hizo con objeto de determinar la zona que dirigía la síntesis de agropina, tanto en los tumores formados por A. tumefaciens ACH5 como en las raíces formadas por A. rhizogenes 15834 ya que, al ser sintetizada en los tumores, esta zona debiera estar incluida en el T-DNA de la estirpe ACH5; de la misma manera, al ser sintetizada en las raíces inducidas por la estirpe 15834, esa zona podría pertenecer a un posible DNA transferido por A. rhizogenes a la célula vegetal, para la implantación del hairy root.

El clon pGV0201 (concentración 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), que contiene el fragmento HindIII 1, fue digerido con HindIII/BamHI, HindIII/Hpa I y HindIII/Sma I, mientras que el pGV0153, conteniendo el fragmento BamHI 8 (concentración 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), lo fue con BamHI/EcoRI, BamHI/HindIII y Sma I sola. Las digestiones se hacían con los dos enzimas al mismo tiempo, originando

diversos fragmentos que fueron separados por electroforesis. Estos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa que se utilizaron para la hibridación con DNA marcado de pRi15834. El lavado de los filtros se hizo a 70°C con una solución que contenía 3x SSC. En otros casos se bajo la temperatura de incubación y lavado a 60°C, que permitía la estabilidad de híbridos con solo un 68 % de homología.

Aunque en el T-DNA del pTiACH5 no hay una homología estricta (a T_m -36°) con el pRi15834, relajando las condiciones (T_m -46°) se observa una región que mapea en la zona común de los fragmentos Hpa I 3 y Sma I 10c, homóloga en un 70 %, ya que los filtros se lavaban a 65°C con 3x SSC, (fotografía nº9).

Utilizando el clon pGV0120, que también forma parte del T-DNA, se observa que uno de los fragmentos obtenidos por digestión con Hind III hibrida con el pRi15834 marcado, cuando la incubación se hace a 70°C con 3x SSC (75 % de homología requerida). Esta zona comprendería por tanto la parte del pTiACH5 incluida en el clon pGV0120 y que no está presentada en el clon pGV0153 y en ella vendría el gen o genes involucrados en la síntesis de agropina en las células tumorales.

De las hibridaciones en el resto del plásmido se deduce que la homología entre pTiACH5 y pRi15834 es menor que la existente entre éste y el pTiC58. De igual manera, tampoco aparece en este caso una homología alta en zonas pertenecientes al T-DNA de ACH5, excepto las señaladas. No son tampoco homólogas las regiones que en el pTiACH5 codifican el catabolismo de octopina y arginina. (fotografía nº10).

Las zonas homólogas se sitúan agrupadas en tres regiones (figura nº4); una de ellas incluye la zona donde

mapean funciones relacionadas con la conjugación del plásmido, (Tra genes). En otra zona están los genes para el catabolismo de agropina (Agc), incompatibilidad entre plásmidos (Inc) y origen de replicación (Ori) y, por último, otra región de homología con tiene diversos puntos donde mapean inserciones afectando la virulencia (Onc⁻). (figura nº5).

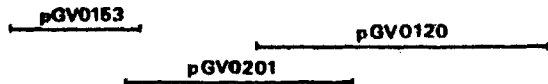
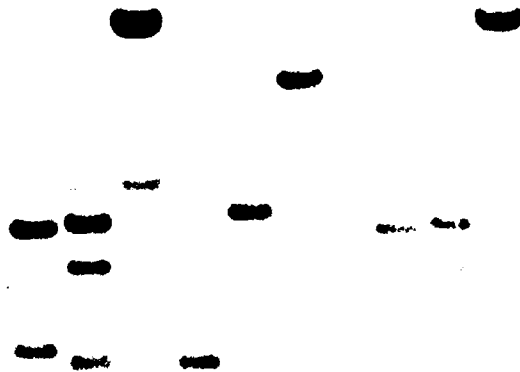
Fotografía nº 9 : clon pGV0153 digerido con BamHI/EcoRI (1), BamHI/HindIII (2) y Sma I (3). Clon pGV0201 digerido con HindIII/BamHI (4), HindIII/Hpa I (5) y HindIII/Sma I (6). Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis y son transferidos a filtros que se hibridan con DNA de pRi15834 marcado. Los filtros se lavan con 3x SSC a 60° 6 65° y las zonas que presentan homología se sitúan en el mapa físico del T-DNA de pTiACH5.

82

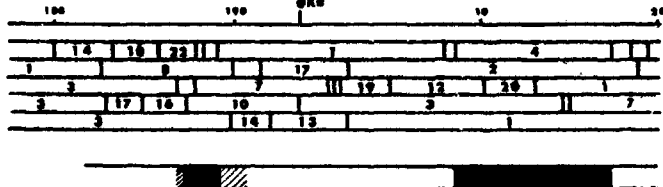
3x SSC 60°

3x SSC 65°

1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6



Hind III
Bam HI
Eco RI
Sma I
Hpa I

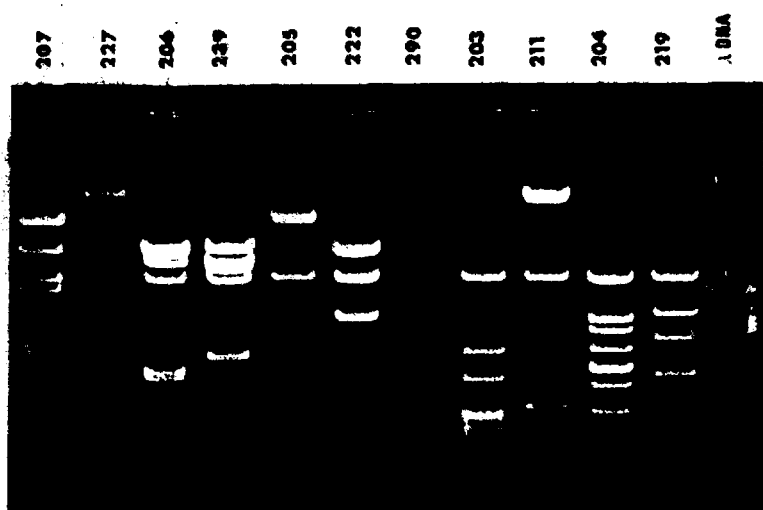


T-DNA ACH5

■ Zonas de homologia con pRI18834

Fotografía nº 10: Digestión con HindIII de los clones que abarcan la longitud de pTiACH5. Los fragmentos de restricción, separados por electroforesis, son transferidos a filtros de nitrocelulosa e hibridados con DNA marcado de pRi15834. Los filtros se lavan con 3x ó 0.3x SSC a 70°C y los autorradiogramas se exponen respectivamente 24 horas y 5 días a -70°C.

85



3X SSC 24h

0.3X SSC 5d

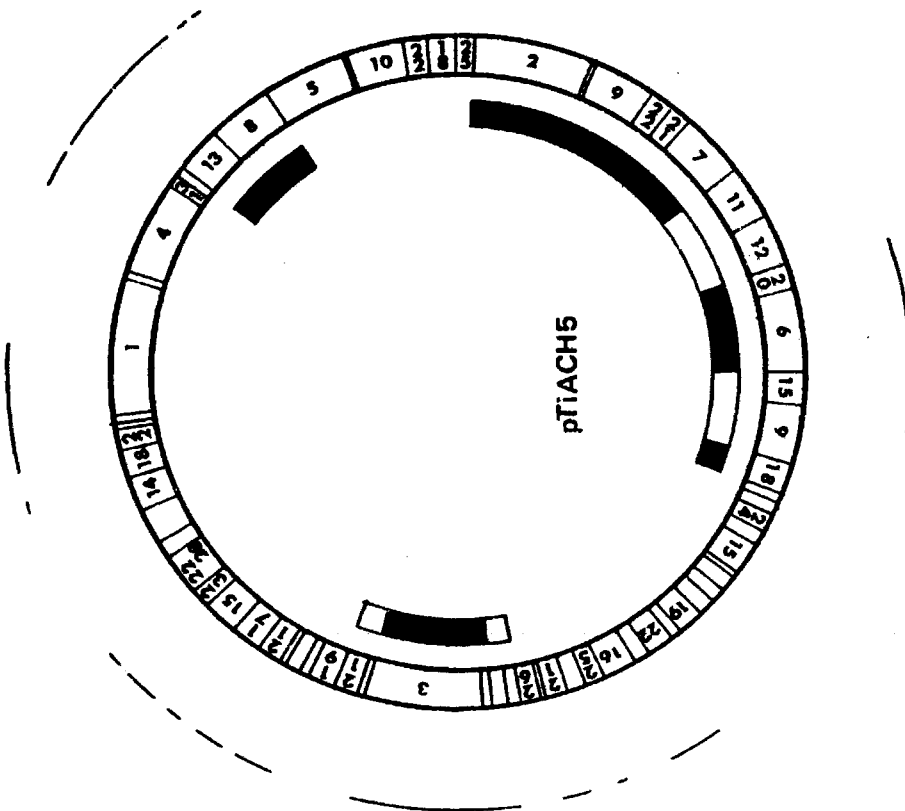
Figura nº 4 : Mapa físico de pTiACH5 con las zonas de homología con el pRi15834.

Figura nº 5 : Mapa genético de pTiACH5 indicando las funciones codificadas en regiones homólogas con pRi15834.

Homologias con pT19034



Homologias con pT1C50

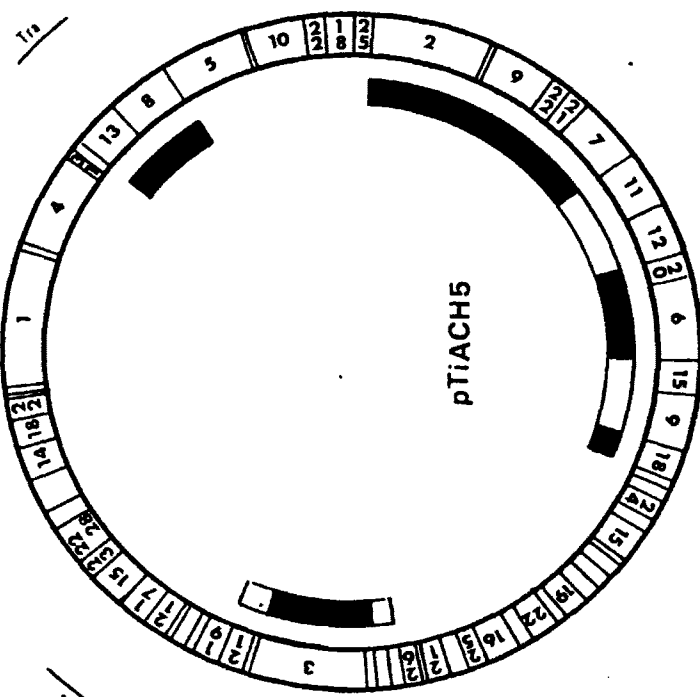


80

Handwritten text: [illegible]

Dec

Age



1st
011

Dec

Dec

Dec

3.8. TRANSCRIPCION DE DNA BACTERIANO EN RAICES INDUCIDAS POR A. RHIZOGENES 15834

3.8.1. Extracción de RNA de raices

Se utilizaron cultivos líquidos estériles de raices inducidas por A. rhizogenes 15834; tomamos 42 g de raices, que se homogeneizaron eliminando los residuos por centrifugación. El RNA se extrajo al someter el sobrenadante a un gradiente de CsCl y, tras precipitarlo, se redisolvió en 500 µl de agua estéril. Se tomaron 20 µl de esta solución para separar los RNA en electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer fosfato pH 7.0. Tras 4 horas a 100 V, se tiñe el gel con bromuro de etidio y se toman las fotografías, iluminándolo con luz ultravioleta (fotografía nº11).

Por otra parte se midió el espectro de absorción de la solución de RNA entre 300 y 200 nm. La absorción a 260 nm, dilución 1:40, era 1.88 que equivale a 3.76 mg/ml en la solución inicial.(figura nº6).

Para usarlo como control obtuvimos RNA a partir de plantas de patata sin esterilizar. Cortamos 41 g de raices y las lavamos con agua estéril. De la misma manera obtuvimos el RNA que, una vez precipitado, se resuspendió en 500 µl de agua estéril. Se pusieron 20 µl en un gel de agarosa y se sometió a electroforesis. Al medir el espectro de absorción de esta solución de RNA, entre 320 y 200 nm, obtuvimos los resultados indicados en la figura nº7, donde la absorción a 260 nm, dilución 1:40, era 1.95, que se corresponde con una concentración de 3.9 mg/ml en la solución inicial de RNA.

3.8.2. Preparación del cDNA

Según lo descrito en Materiales y Métodos, tomamos 100 μ l de la solución de RNA (3.76 mg/ml) obtenido de las raíces inducidas por A. rhizogenes 15834 y añadimos a la mezcla de incubación una cantidad de (α^{32} P) dCTP equivalente a 200×10^6 cpm. Tras la incubación con AMV transcriptasa inversa, tomamos una muestra de 5 μ l y precipitamos el DNA-RNA formado con TCA al 10 %, midiendo la radiactividad incorporada. La marca era 1.36×10^6 cpm, que hay que multiplicar por 34, ya que el volumen de la solución de incubación era 170 μ l, y por 2, ya que utilizamos agua en lugar de líquido de centelleo. Esto significa una radiactividad incorporada en DNA de 92.5×10^6 cpm, que frente a los 200×10^6 cpm ofrecidos, significa un 46.2 % de incorporación.

Mientras tanto, denaturamos el híbrido DNA-RNA, eliminamos las proteínas con proteinasa K, fenolizando posteriormente, y separamos el cDNA marcado radiactivamente de los nucleótidos (α^{32} P) dCTP, por fraccionamiento en una columna Sephadex G 50, colectando fracciones de 5 μ l. Medimos la radiactividad en un contador de centelleo y agrupamos las fracciones de máxima marca, midiendo nuevamente su actividad (0.11×10^6 cpm/5 μ l). El volumen total recogido es 2.16 ml (47.5×10^6 cpm totales).

Como control preparamos cDNA radiactivo a partir del RNA extraído de raíces de patata sin infectar, comprobando de esta manera si la utilización de oligo dT como iniciador para la síntesis de cDNA servía para eliminar la contaminación del posible RNA bacteriano presente, que no transcribiría

con una cola de poli A. Tomamos 100 μ l de la solución de RNA, in cubándolo con 200×10^6 cpm de (α 32 P) dCTP y transcriptasa inversa. Tomamos una muestra de 5 μ l cuya radiactividad era 1.39×10^6 cpm, siendo la radiactividad incorporada en DNA de 94.5×10^6 cpm, con un 47.2 % de incorporación.

Medimos la radiactividad de las fracciones obtenidas al separar la muestra en una columna de Sephadex G 50 y agrupamos aquellas de máxima actividad, midiendo la actividad total en una muestra de 5 μ l (0.12×10^6 cpm). El volumen total es 1.86 ml (44.6×10^6 cpm totales).

3.8.3. Hibridación cDNA-DNA pRi15834

Para preparar los filtros digerimos con SmaI 1.5 μ g de DNA de pRi15834, purificado en gradiente de CsCl; separamos los fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa, utilizando como control DNA de fago lambda digerido con Pst I, y los transferimos a un filtro de nitrocelulosa. Una vez fijado el DNA, pusimos a preincubar el filtro en una solución con 6x SSC como contenido en sal, manteniéndolo durante la noche a 72°C en un baño de agua.

Antes de empezar la hibridación, se calentó el cDNA obtenido a 100°C durante 10 min. y se enfrió rápidamente en hielo. Después se le añadió un volumen igual de la solución utilizada durante la preincubación, (contenido final en sal 3x SSC), mantenida a 72°C y se vierte en las bolsas con los filtros, una vez eliminada la solución de preincubación. Se cierran las bolsas y se deja incubar durante 40 horas, tras las cuales lavamos con una solución que contenía 3x SSC manteniendo la tem

peratura a 72°C.

Como control repetimos el mismo procedimiento, hibridando otro filtro de DNA de pRi15834 digerido con Sma I, con el cDNA obtenido a partir del RNA extraído de patatas sanas.

Una vez lavados, se secaron los filtros durante $\frac{1}{2}$ hora a 80°C en vacío y se introdujeron en el cassette para autorradiografía, dejándolo a -70°C durante 24 horas. Tras esta exposición aparecen tres bandas que presentaban marcaje, de 8.6, 8.0 y 2.4 Md, y una cuarta posible de 4.8 Md. No aparece marcaje en el control, como era de esperar. Prolongando la exposición durante cinco días, se confirmaba la presencia de las cuatro bandas, apareciendo una quinta de peso molecular 5.6 Md; no se detectó marcaje en el control. (fotografía nº12).

Por otro lado utilizamos este mismo cDNA para hibridar con filtros que contenían los T-DNA de A. tumefaciens C58 y ACH5. En el caso del pTiC58 se utilizaron los clones que contenían por separado los fragmentos HindIII del T-DNA. Para pTiACH5 hicimos dobles digestiones, según se indicó anteriormente. Las hibridaciones se hicieron en las condiciones descritas, es decir, T_m -34°, que permite la estabilidad del heteroduplex con al menos un 76 % de homología, no apareciendo hibridación en ningún caso. Cuando se incluyó el clon pGVO120 del T-DNA de pTiACH5 aparecía una banda de hibridación, confirmando la hipótesis de que allí estaba situado el gen o genes que dirigían la síntesis de agropina.

Fotografía nº 11 : Separacion por electroforesis en gel de agarosa del RNA extraido de las raices inducidas por A. rhizogenes 15834 (2º carril).

5/16

6

10/10/10

10/10/10

10/10/10

10/10/10

10/10/10

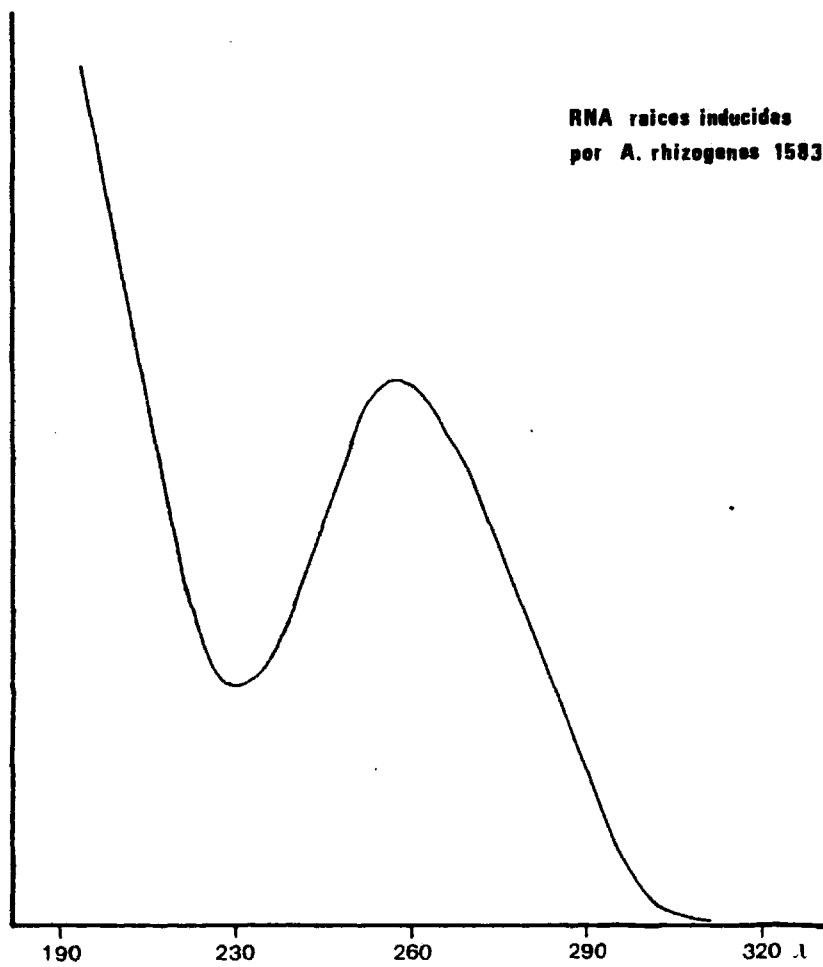
10/10/10

10/10/10

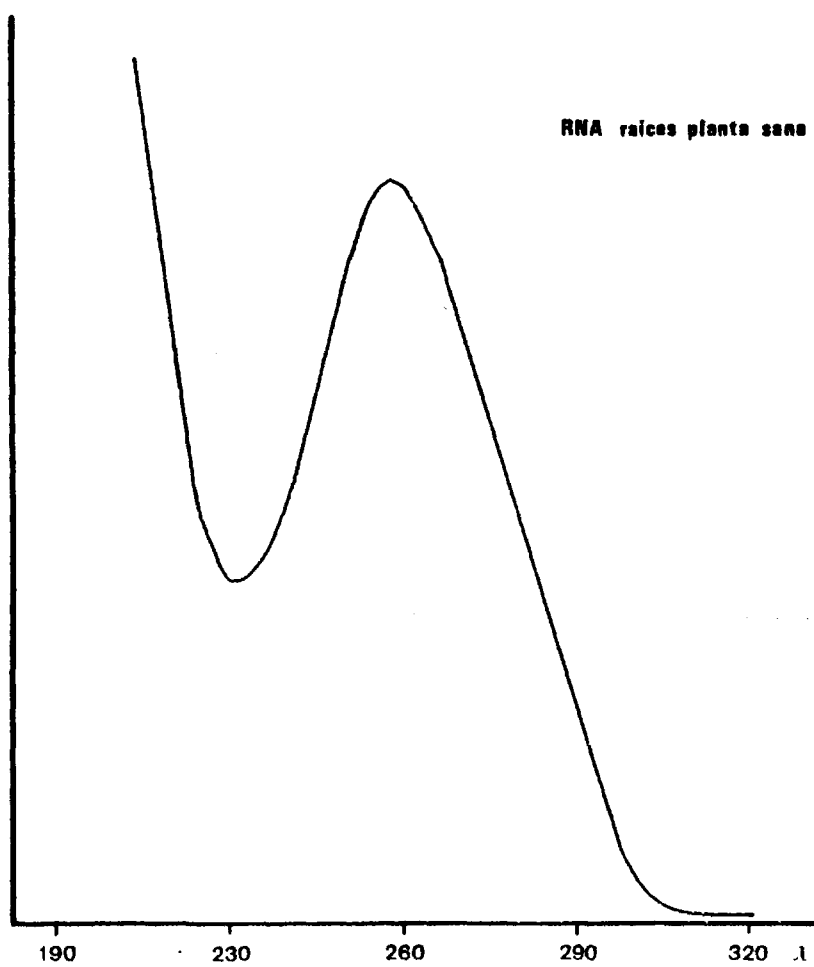
Figura nº 6 : Espectro de absorción entre 320 y 200 nm de la solución de RNA extraído de raíces inducidas por A. rhizogenes 15834.

Figura nº 7 : Espectro de absorción entre 320 y 200 nm de la solución de RNA extraído de raíces de plantas sanas de patata.

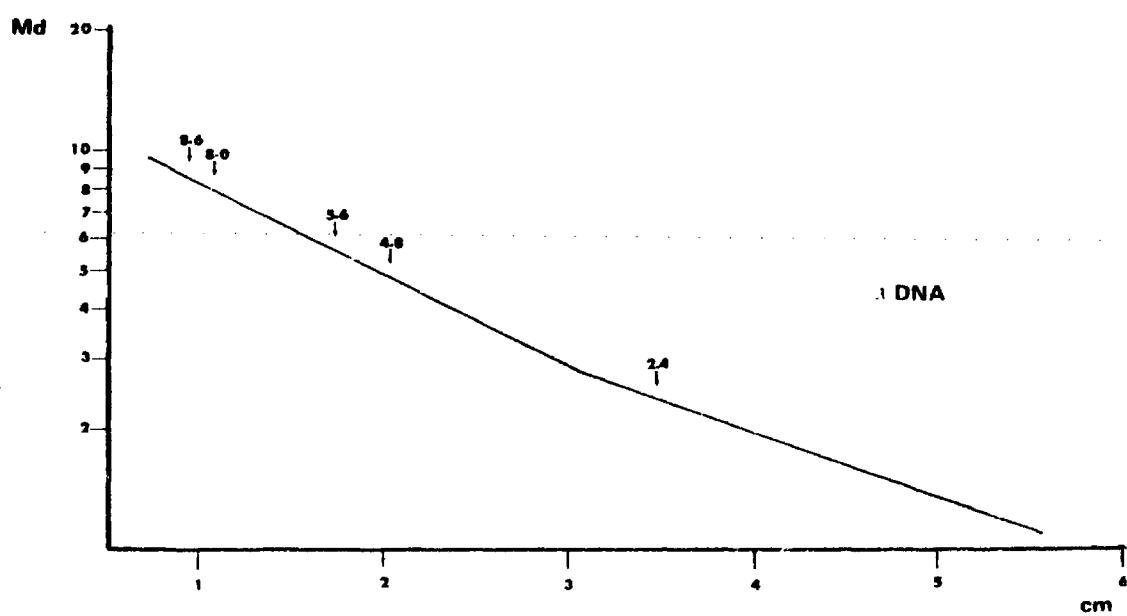
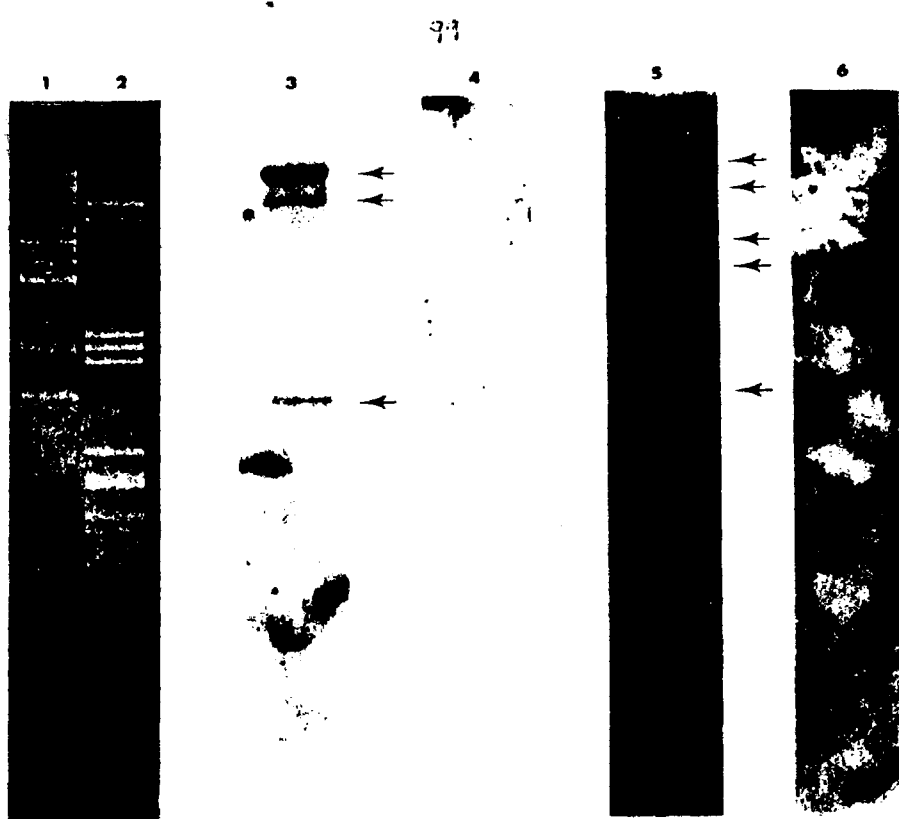
RNA raices inducidas
por *A. rhizogenes* 15834



91



Fotografía nº 12 : DNA de pRi15834 digerido con Sma I (1). Este DNA fue transferido a filtro de nitrocelulosa e hibridado con cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de raíces inducidas por A. rhizogenes 15834, exponiendo los autorradiogramas 24 horas (3) ó 5 días (5), apareciendo varias bandas que hibridan. Como control se hibridó cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de plantas sanas, (4 y 6). A partir de la digestión de DNA de fago lambda con Pst I (2), pudimos establecer los pesos moleculares de las bandas que hibridan, (Gráfica).



DISCUSSION

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria gram negativa, presente de manera habitual en el suelo que, al infectar, a través de una herida, plantas dicotiledoneas o gimnospermas, origina una enfermedad denominada "crown gall", que se caracteriza por la aparición de hiperplasias de naturaleza tumoral. Esta transformación tumoral es debida a la integración en el núcleo de la célula vegetal (15, 108) de una parte, región T (4), de un plásmido de gran tamaño (plásmid Ti) presente en todas las estirpes patógenas (114). Este T-DNA presenta un tamaño variable según los cultivos tumorales investigados (67, 102) y en él, además de los genes responsables de la iniciación y mantenimiento del estado tumoral, se sitúan otros genes (42, 45, 112) que dirigen la síntesis por parte de la célula vegetal de nuevos compuestos denominados genericamente opinas (100), ausentes en las plantas sanas (54). Estas opinas pueden ser usadas como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (71), por aquellas estirpes que han inducido la transformación tumoral, ya que los genes responsables de su catabolismo se sitúan también en el plásmido Ti (9), obteniéndose así una ventaja selectiva en las bacterias portadoras de plásmido. De la misma manera, estos compuestos promueven la conjugación del plásmido Ti (37, 47, 58, 81), al formar parte tanto los genes Tra como los genes respon-

sables del catabolismo de opinas, de dos operones diferentes con un gen regulador común (62).

A. rhizogenes, del mismo género, es el causante del denominado "hairy root", que viene caracterizado por una abundante proliferación radicular en la herida infectada.

Nuestro estudio se ha centrado en los mecanismos que conducen a la implantación del hairy root observando su relación con los procesos que intervienen en el crown gall, donde la transferencia de DNA de la bacteria a la planta, la integración de éste y su transcripción y expresión constituyen los eventos fundamentales de la transformación celular. Para ello hemos utilizado la estirpe 15834 de A. rhizogenes caracterizando fenotipos del género Agrobacterium. Así, hemos demostrado que la estirpe no es capaz de realizar la fermentación de lactosa a 3-cetolactosa, como sucede con todos los A. rhizogenes estudiados y parte de los A. tumefaciens (43). El género Agrobacterium puede ser clasificado en base a pruebas bioquímicas, en dos biotipos (60), formándose un tercero con aquellas especies no clasificadas en los otros dos (59). El primero comprendería los A. tumefaciens y otras especies no patógenas, siendo todos ellos capaces de formar 3-cetolactosa. En el biotipo 2 se incluyen los Agrobacterium no productores de 3-cetolactosa, tanto estirpes de A. tumefaciens como de A. rhizogenes. La estirpe 15834 de A. rhizogenes utilizada en nuestro trabajo parece por tanto pertenecer a este biotipo 2.

Hemos prestado especial atención a los fenotipos que en A. tumefaciens vienen codificados por los plásmidos Ti. Así, estudiamos la sensibilidad de la estirpe 15834 a agrocin 84, bacteriocidina sintetizada por A. radiobacter K34 (84), que afecta a los Agrobacterium portadores de un plásmido Ti tipo

nopalina. Esta bacteriocidina es un 6-N-fosforamido de un análogo del nucleótido de adenina (91) con estructura similar a la agrocina, compuesto tipo opina que puede ser catabolizado por las bacterias portadoras del mismo plásmido Ti tipo nopalina (3), ya que ambos compuestos son sustratos de una misma permeasa. Nuestra estirpe ha resultado ser resistente a agrocina 84 en todas las pruebas realizadas, a pesar de estar descrita como sensible, habiéndose detectado además la presencia de agrocina, su análogo, en las raíces inducidas por esta bacteria.

Otro carácter codificado en los plásmidos Ti es la capacidad de utilizar octopina y nopalina como fuente de carbono y/o nitrógeno (9). Ninguno de estos compuestos puede ser utilizado por A. rhizogenes 15834 como fuente de energía. Sin embargo, tras una incubación prolongada de placas suplementadas con octopina como única fuente de nitrógeno, aparecen mutantes que se desarrollan normalmente; Esta utilización de octopina vendría codificada por un gen cromosomal presente en el biotipo 2 de Agrobacterium (78), bien diferenciado de aquel que portan los plásmidos Ti, siendo este último inducible por el sustrato (61). En ningún caso se ha detectado la presencia de octopina o nopalina en las raíces inducidas por A. rhizogenes 15834, tanto en los cultivos estériles, sólidos o líquidos, como en raíces recién formadas, lo que está en consonancia con su no utilización por la bacteria.

Una vez establecidos los cultivos de raíces inducidas por la estirpe 15834, hemos detectado en ellos la presencia de agropina, manopina y agrocina, compuestos que presentan actividad tipo opina en A. tumefaciens. La agrocina es un compuesto presente en los tumores inducidos por estirpes portadoras de plásmidos tipo nopalina, descubierto como conse-

cuencia de un estudio relacionado con la sensibilidad de esas estirpes a agropina 84 (30). La agropina es un compuesto presente en los tumores inducidos por algunas estirpes tipo octopina, alcanzando en ellos hasta un 7 % del peso seco del tumor (34). La manopina puede representar un precursor con cadena abierta de la agropina (98). Ninguno de estos compuestos aparece en los extractos de raíces de plantas sanas. Estos compuestos han sido también detectados en cultivos de raíces inducidos por A. rhizogenes A4 (101) y su actividad como opinas, que incluye la posibilidad de ser catabolizados por la bacteria inductora y su capacidad de promover o aumentar la frecuencia de conjugación de sus plásmidos, parece probada (16).

La principal característica que confieren los plásmidos Ti a las estirpes portadoras, es su capacidad para transformar la célula vegetal, originando la aparición de tumores, que representarían zonas de acúmulo de compuestos metabolizables exclusivamente por la bacteria. Su participación en la virulencia había sido probada para A. rhizogenes 15834 (79), viendo que estirpes virulentas se convertían en avirulentas, recuperando la patogenicidad al recibir por conjugación unplásmido de la estirpe 15834 (106). Esta estirpe es portadora de tres plásmidos, de pesos moleculares 107, 154 y 258 Md, siendo este último un cointegrado de los dos primeros. A lo largo de nuestro trabajo hemos detectado, tanto por electroforesis en geles de agarosa de lisado bacteriano, como por microscopía electrónica de DNA purificado por ultracentrifugación en gradiente de CsCl, la presencia de plásmidos. Estos han sido caracterizados mediante digestiones con diferentes enzimas de restricción, comprobando que la suma de los pesos moleculares de los fragmentos generados se corresponde con lo esperado para los plásmidos descri-

tos.

La virulencia de la estirpe 15834 viene determinada por el plásmido de 154 Md, que se denomina plásmido Ri (root inducing), mientras que la sensibilidad a agrocin 84 se sitúa en el plásmido de 107 Md (106). Sin embargo, el cointegrado sigue dotando a la bacteria portadora de su carácter virulento, por lo que también puede ser considerado como plásmido Ri.

La dificultad que presenta el aislamiento del DNA plasmídico de A. rhizogenes 15834, por causas todavía sin determinar, pero que podrían deberse tanto a su gran tamaño como a asociaciones con proteínas de membrana, que impedirían su separación, nos ha llevado a desarrollar un método modificado a partir de otros existentes, que evita en lo posible la agitación del lisado y la fenolización de la muestra para la eliminación de proteínas. Mediante este sistema es posible obtener, dependiendo de las preparaciones, entre 30 y 50 µg de DNA plasmídico, purificado por ultracentrifugación, a partir de 2 litros de cultivo bacteriano crecido durante 24 horas.

Las mutaciones que afectan a la virulencia de la estirpe en A. tumefaciens se distribuyen a lo largo del plásmido Ti (mutaciones Onc^-); de ellas una parte mapea en la zona de DNA que es transferida a la célula vegetal (T-DNA); sin embargo, un gran número se sitúa fuera de la región T (44), agrupándose en distintas zonas que suelen coincidir con las regiones de homología entre los plásmidos Ti de tipo octopina y nopalina (31). Estas mutaciones afectarían a genes involucrados en procesos previos a la integración del DNA en la célula vegetal, que estarían relacionados con el paso de DNA de la bacteria a la planta y su integración en el núcleo de la célula.

Con objeto de estudiar los mecanismos que con

ducen a la aparición del hairy root, hemos investigado la homología existente entre los plásmidos de A. rhizogenes 15834 por un lado con el pTiC58, como plásmido tipo nopalina, y con el pTiACH5 como plásmido tipo octopina, por otro. Utilizando los mapas físicos y genéticos que existen para los pTiC58 y pTiACH5 (23, 25, 28, 45), hemos podido localizar las regiones de homología con el pRi15834 y relacionarlas con las funciones codificadas en ellas, tanto en A. tumefaciens C58 como en A. tumefaciens ACH5. Variando las concentraciones de Na^+ y las temperaturas de hibridación, hemos establecido dos condiciones de mapeo diferentes, que se corresponden con un 75 % y un 86 % de homología respectivamente. Las zonas de 86 % de homología representan posiblemente zonas iguales entre los plásmidos, mientras que las zonas con 75 % de homología provengan posiblemente de regiones comunes que se han diversificado a lo largo del tiempo.

Si pensamos que el hairy root se produce mediante un mecanismo similar al crown gall, que implica una integración de DNA bacteriano en las células de la raíz, parece lógico empezar el estudio de las homologías centrándonos en las regiones T de los plásmidos Ti. Además, tanto en los tumores inducidos por algunas estirpes con plásmidos Ti tipo octopina, como en las raíces inducidas por A. rhizogenes 15834, se detecta la presencia de agropina como resultado de la proliferación del tejido. Por lo tanto, los genes que dirigirían la síntesis de agropina en tumores o raíces, habrían de formar parte de la región que se transfiriera a la célula vegetal, siendo comunes en los dos procesos.

Estudiando la homología entre pRi15834 y la región T del pTiACH5 nos centramos en primer lugar en la región izquierda del T-DNA (TL-DNA). Este borde izquierdo del T-DNA pa

ree ser constante en los tumores que sintetizan octopina, mien
 tras que el borde derecho presenta más variaciones, incluyéndose
 allí en algunos tumores, regiones de DNA que no aparecen en o-
 tros (22, 102). Haciendo hibridaciones en condiciones de incuba-
 ción que permitían el apareamiento de heteroduplex con un 75 %
 por lo menos, de homología, observamos que el pRi15834 no conte-
 nía ninguna región que se correspondiera, en esas condiciones,
 con secuencias presentes en el TL-DNA de ACH5. Suponiendo que
 la región que codificara la síntesis de agropina (Ags) pudiera
 ser de pequeño tamaño, hicimos dobles digestiones con enzimas
 de restricción de los clones que contenían este TL-DNA (pGV0153
 y pGV0201). De esta manera, los fragmentos analizados eran más
 pequeños, permitiendo así la detección de secuencias menores de
 alta homología. En cualquier caso no aparecen zonas de homología
 con menos del 25 % de desapareamiento. Incubando en condiciones
 menos estrictas, que permitían la estabilidad de heteroduplex
 compartiendo solo un 68 % de homología, aparece hibridación del
 pRi15834 en una región del TL-DNA delimitada por la parte común
 de los fragmento Sma I 10c y Hpa I 3. En los tumores tipo octo-
 pina, esta zona se transcribe en un mRNA de 2.7 kb de longi-
 tud (111) y mutaciones en esa región provocan la aparición de
 brotes en los tumores (65). Esta región del TL-DNA regularía
 funciones que impedirían la diferenciación hacia tallo de las cé-
 lulas transformadas. Esto, junto con la no existencia de homolo-
 gía con las regiones que impiden la aparición de raíces en los
 tumores octopina, sugiere la presencia de un mecanismo similar
 en crown gall y hairy root, habiendo en ambos una represión en
 la diferenciación hacia tallo, no existiendo en el último la re-
 presión que impide la formación de raíces.

Utilizando el clon pGV0120 observamos la a-

aparición de hibridación en una región comprendida en los fragmentos EcoRI 20 y la parte de EcoRI 12 no incluida en el clon pGV 0201. Las condiciones de hibridación permiten la estabilidad de heteroduplex con un 75 % de homología. En esta zona ha de encontrarse localizado el gen de síntesis de agropina en la estirpe ACH5 de A. tumefaciens, que además estaría presente en el posible T-DNA del pRi15834, ya que extrayendo el mRNA de raíces inducidas por esta estirpe y fabricando su cDNA, se observa homología entre éste y la zona señalada antes.

Para estudiar la región T del pTiC58, utilizado como plásmido tipo nopalina, empleamos clones que contenían un solo fragmento de restricción HindIII en cada uno de ellos. El T-DNA de la estirpe C58 comprende los 8 fragmentos HindIII que van desde el número 10 al 23 ambos inclusive. En condiciones que permitían la hibridación de DNA que compartiera un 75 % de homología, solo aparece marcaje radiactivo en la posición del fragmento HindIII nº10, borde derecho de este T-DNA, hibridación que desaparece con el lavado con 0.3x SSC a 70°C (86 % de homología requerida). Este fragmento HindIII nº10 se transcribe activamente en los tumores inducidos por A. tumefaciens C58 sin que se le haya asignado ninguna función (44). Sin embargo, su presencia en un mRNA de 0.6 Md en los tumores así como su homología con los plásmidos de A. rhizogenes 15834 parecen sugerir que estuviera relacionado con la síntesis de agropinopina, tanto en los tumores como en las raíces.

De los resultados obtenidos en estas hibridaciones se desprende que las proteínas implicadas en el establecimiento y mantenimiento de la transformación celular han de ser diferentes en el hairy root y en el crown gall, ya que en éste, el T-DNA que se integra en la célula vegetal, no se encuen

tra en los plásmidos de la estirpe 15834. Solo aparece homología estricta en regiones que parecen codificar la síntesis en la célula de las opinas inducidas por A. rhizogenes 15834, siendo por tanto funciones dispensables para el mantenimiento de la transformación. La homología con la parte del fragmento Sma I 14c contenida en el Hpa I 3 no tiene una función clara ya que, si bien esa zona codifica en los tumores inducidos por A. tumefaciens ACH5 la represión de diferenciación hacia tallo, función que se ajustaría al desarrollo del hairy root, el grado de homología es demasiado bajo para considerar funciones idénticas en ambos casos. Una explicación pudiera ser la existencia de una secuencia más pequeña de alta homología, contenida en ese fragmento, que tiene aproximadamente 2.5 kb de longitud, y que no habría sido detectada en nuestro análisis. Sin embargo, en A. tumefaciens A6NC, las mutaciones por inserción del transposón Tn5, afectando la formación de raíces y favoreciendo la aparición de tallos en tumores inducidos en determinadas plantas, mapean en una región de 3.1 kb (36), lo que parece estar en desacuerdo con restringir la función a una región de tamaño inferior a 2.5 kb (1.6 kb de tamaño máximo). En cualquier caso, la mayor extensión de las secuencias implicadas podría deberse a efectos plares tras la mutagénesis por transposición (63).

Existen diversos mutantes avirulentos o atenuados de A. tumefaciens que presentan una región T normal. Estas mutaciones mapean tanto en el cromosoma bacteriano como en zonas del plásmido Ti no pertenecientes a la región T (35). Estas últimas suelen coincidir con regiones de homología entre los plásmidos tipo octopina y nopalina y estarían relacionadas con la transferencia del T-DNA al núcleo de la célula vegetal o con el balance hormonal. Se sabe que A. tumefaciens excreta

transzeatina al medio (73), viniendo su síntesis codificada en el plásmido Ti; las mutaciones que afectan a su síntesis producen bacterias avirulentas, sugiriendo una alteración hormonal al comenzar la proliferación celular. El estudio de la homología en toda la extensión del pRi15834 con los pTiC58 y pTiACH5 nos proporciona una idea de las funciones previas a la actuación del T-DNA una vez integrado en el genoma vegetal. Así hemos utilizado para las hibridaciones clones que abarcan toda la longitud de los plásmidos Ti de C58 y ACH5, de los que se conoce su mapa físico. Hemos establecido igualmente dos condiciones de hibridación, siguiendo las técnicas del Southern "blotting", que permitían la estabilidad de heteroduplex compartiendo un 75 % y un 86 % de homología respectivamente. Las últimas se corresponderían con secuencias prácticamente idénticas entre los plásmidos, siendo la variación de las otras debida a una divergencia a partir de un antecesor común.

Como se esperaba, las regiones de homología se agrupan preferentemente en las zonas comunes entre los plásmidos Ti de A. tumefaciens C58 y ACH5. En el caso del pTiC58, la zona homóloga se agrupa, excepto los fragmentos HindIII 8 y 35, en una única región que presenta algunas discontinuidades de menor homología. Esto se puede interpretar como la presencia de esa región del pTiC58 en el pRi15834, donde se habrían producido diversas reestructuraciones, eliminando o variando secuencias que no codifican procesos esenciales para la infectividad de A. rhizogenes 15834.

Las homologías entre pRi15834 y pTiACH5 se encuentran más repartidas a lo largo del mapa de este último. A parece una región común de mayor extensión, agrupándose el resto en dos zonas, una incluyendo los fragmentos HindIII 8, 13 y

33 y otra más discontinua, situada alrededor del fragmento 3 de HndIII.

Haciendo corresponder estas homologías en los mapas genéticos establecidos para pTiC58 y pTiACH5, hemos determinado qué funciones codifican en A. tumefaciens, suponiendo que en las zonas donde la homología es máxima, la función codificada estará también presente en A. rhizogenes 15834. Así, en la zona homóloga entre pRi15834 y pTiC58 se sitúan todas las mutaciones que afectan a la virulencia (Onc^-), siempre en zonas de máxima homología (86 %). Igualmente se encuentra presente el gen de sensibilidad a agrocina 84 (Agr) aunque, como se dijo anteriormente, la bacteria es resistente a esta bacteriocidina, pudiendo deberse este hecho a la existencia de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones, no detectadas por este método. Por último, en esta zona homóloga se encuentran los genes implicados en la transferencia del plásmido (genes Tra), lo que permite suponer que el plásmido Ri es un plásmido conjugativo, con mecanismos a este nivel similares a los Ti, ya que su frecuencia de conjugación es muy superior al realizar los cruces en la misma planta (106), lo que sugiere que los genes Tra de A. rhizogenes 15834 sean inducibles por alguna opina sintetizada en la raíz tras la infección.

Al igual que los genes situados en la región T, no están presentes, como era de esperar, los que regulan el catabolismo de nopalina que, por otro lado, no es sintetizada en las raíces inducidas por la estirpe 15834. Las regiones del plásmido Ti de C58 no homólogas con el pRi15834 no presentan ninguna función asignada en A. tumefaciens; estas zonas, en caso de transcribirse, codificarían funciones no relacionadas directamente con la transformación celular, pudiendo en algunos

casos estar implicadas en procesos muy específicos del crown gall, cuya mutación no alterara visiblemente el fenotipo.

En el caso del pTiACH5 no existe homología en las regiones implicadas en el catabolismo de arginina (Arc) y octopina (Occ), igual que sucedía con las otras opinas en el pTiC58. Situados en regiones de homología están naturalmente los genes implicados en el catabolismo de agropina (Agc), cuya síntesis se realiza en raíces inducidas por A. rhizogenes 15834 lo mismo que en la estirpe A4 (101). También se encuentran presentes los genes involucrados en la transferencia del plásmido (Tra), al igual que sucedía en el pTiC58. Es de resaltar la proximidad en el pTiACH5, de los genes Tra y Agc, que hace pensar en una relación entre el catabolismo de agropina y la movilización del plásmido. Así, la región homóloga en el pRi15834 podría proceder de un pTiACH5 donde se hubiera producido una delección de las secuencias implicadas en el catabolismo de octopina, aproximando los genes Tra a los Agc, pudiendo ser la conjugación del plásmido inducida por agropina, como parece ser el caso (16).

De la misma forma que en el pTiC58, las mutaciones Onc^- , afectando virulencia, se sitúan mayoritariamente en regiones homólogas. Mención especial requieren las secuencias relacionadas con la incompatibilidad de plásmidos. Existen zonas relacionadas con la replicación de los plásmidos y adyacentes a su origen, que afectan al número de copias de un plásmido (104) permitiendo o impidiendo, de esta manera, la coexistencia en una misma bacteria de dos plásmidos diferentes. De esta forma, una secuencia Inc igual sería formadora/receptora de una proteína común, lo que implicaría que uno de los plásmidos desapareciera al multiplicarse la bacteria (3). En este caso se dice que ambos plásmidos no son compatibles, perteneciendo por

definición al mismo grupo de incompatibilidad (85).

Para los pTiC58 y pTiACH5 las mutaciones que afectan a la incompatibilidad se sitúan en zonas homólogas a pRi15834; la afirmación no es concluyente, ya que el mapeo por transposición es solo aproximado, dependiendo del número de mutaciones estudiadas. Sin embargo, si las secuencias Inc fueran iguales en pRi15834 y en pTiC58 y pTiACH5 significaría que ambos plásmidos no podrían coexistir en una misma bacteria; éste, que es cierto para pTiC58 y pTiACH5 (46) no lo es entre éstos y pRi15834 (18). Las secuencias Inc se sitúan proximas y están de alguna manera relacionadas con el origen de replicación (ori) (52); este origen se emplaza en el pTiACH5 bordeando zonas de menor homología con el pRi15834, mientras que en el pTiC58 está en una zona no homóloga. Esto puede significar que el origen de replicación de pRi15834 es diferente al de los plásmidos Ti, no siendo afectado por la acción de Inc, lo que le permite coexistir con estos plásmidos.

De los estudios sobre las homologías entre los plásmidos Ti de A. tumefaciens ACH5 y C58 con A. rhizogenes 15834 se desprende que los plásmidos Ri comparten características tanto de los plásmidos tipo octopina como de los tipo nopalina, estando presentes, por un lado, las regiones comunes entre ambos, que estarían relacionadas con el paso de DNA a la célula vegetal, y, por otro lado, genes específicos de cada tipo, como son la síntesis de agrocinopina y la sensibilidad a agrocin 84 (tipo nopalina) o la síntesis de agropina (tipo octopina). Si a esto se añade la observación de la presencia de dos plásmidos diferentes en A. rhizogenes 15834, puede aventurarse la hipótesis de que ambos proceden de distintos plásmidos Ti evolucionados, capaces de coexistir en la misma bacteria, de los

que uno, el más pequeño, conserva caracteres propios del tipo nopalina, como es la sensibilidad a agrocina 84, y el otro, de 154 Md, lleva caracteres similares a los del tipo octopina, como es la síntesis de agropina; éste es el portador de la region T del pRi15834 ya que la agropina se sintetiza en las raíces inducidas tras la infección, existiendo además homología con la región encargada, en el T-DNA de ACH5, de la prevención de la formación de brotes. Sin embargo, estos hechos no pueden excluir la presencia, en el DNA transferido a las raíces, de secuencias homólogas a los plásmidos nopalina, bien por la síntesis de agrocinopina en las raíces o bien por la homología con el fragmento HindIII 10, perteneciente al T-DNA de A. tumefaciens C58.

Para comprobar la presencia de secuencias del pRi15834 en las células de las raíces inducidas tras la infección con A. rhizogenes seguimos un método indirecto. De manera similar al crown gall, si se integran secuencias del plásmido en el genoma vegetal, éstas han de transcribir se dando origen a proteínas implicadas en el mantenimiento de la transformación tumoral o en la síntesis de opinas (agropina, manopina y agrocinopina). Si el modelo del crown gall es válido, estas secuencias se debieran transcribir en mRNAs que llevaran una cola de poli A (86), a la manera de los RNAs eucarióticos (110). Esto presenta la ventaja adicional de poder seleccionarlos con oligo dT, evitando así la contaminación con RNA bacteriano, que no presenta esta estructura.

Una vez aislado este mRNA en las raíces, se sintetizó su DNA complementario marcado radiactivamente y se hibridó este cDNA contra DNA de pRi15834 cortado con Sma I. Aparecen 4 bandas marcadas y una quinta tras una mayor exposición del autorradiograma. La intensidad relativa de cada una puede refle

ja tanto diferencias en el nivel de transcripción como el tamaño de los mRNA que hibridan con cada una de ellas.

Se puede hacer una estimación del tamaño del DNA integrado sumando los pesos moleculares de las bandas que hibridan. Así, el DNA introducido por A. rhizogenes 15834 debiera tener un peso molecular cercano a 27 Md, que es el doble del tamaño de la región T de los plásmidos nopalina (67). Sin embargo, asumiendo que el T-DNA se integra en el cromosoma de la célula vegetal (115), dos de los fragmentos representarían uniones entre el T-DNA y el DNA de la planta, lo que podría reducir su tamaño estimado hasta 12-13 Md, que se corresponde con los tamaños de los T-DNAs en el crown gall. Esto no tiene en cuenta la posibilidad de que este T-DNA se integre con repeticiones en serie, varias copias juntas, como sucede en algunas líneas de tumores (115) o que existan regiones que no transcriban.

De esta manera, A. rhizogenes 15834, al infectar la planta a través de una herida, integraría, mediante mecanismos similares a los empleados por A. tumefaciens en la formación del crown gall, una región de DNA perteneciente al pRi 15834, en el genoma de la célula vegetal. Este T-DNA se uniría covalentemente a DNA cromosómico de la planta, transcribiéndose en mRNAs típicamente eucarióticos, que darían lugar a proteínas implicadas en dos funciones: por un lado relacionadas con la síntesis de compuestos metabolizables por la bacteria inductora, (agropina, agrocinopina), actuando otras, por otro lado, sobre el balance hormonal de la célula vegetal, cuya alteración permanente conduce a la formación de raíces, síntoma característico del hairy root.

RESUMEN

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria gram negativa que origina una enfermedad denominada crown gall, que afecta a la mayoría de las plantas dicotiledoneas y se caracteriza por la aparición de hiperplasias de naturaleza tumoral. Esta transformación es debida a la integración en el genoma vegetal de una parte (T-DNA) de un plásmido de gran tamaño (plásmido Ti) presente en las estirpes virulentas.

Junto con los genes necesarios para el mantenimiento de la transformación tumoral, este T-DNA lleva genes que codifican la síntesis, en la célula vegetal, de unos compuestos que pueden ser metabolizados exclusivamente por la bacteria inductora, viéndose así favorecida selectivamente. Estos compuestos, opinas, favorecen también la conjugación del plásmido Ti, ayudando a su diseminación.

Agrobacterium rhizogenes origina en plantas dicotiledoneas, una enfermedad, hairy root, cuyos síntomas son la gran proliferación de raíces en el punto de infección y su persistencia una vez eliminada la bacteria. Con objeto de determinar si esta enfermedad era causada por una integración de DNA bacteriano en la célula vegetal, hemos estudiado la virulencia de la estirpe 15834 sobre diversas plantas de experimentación.

De nuestro trabajo hemos deducido que la estirpe 15834, perteneciente al biotipo 2 de Agrobacterium, es

resistente a agrocina 84, bacteriocidina sintetizada por Agrobacterium radiobacter K84, estando este dato en contradicción con lo descrito anteriormente. Nuestra estirpe no es capaz de metabolizar octopina o nopalina, usándolos como fuente de energía. En las raíces inducidas tampoco se ha detectado la presencia de estos compuestos. Sin embargo, se ha determinado la presencia en estas raíces, de agropina y manopina, compuestos de actividad tipo opina en algunas estirpes de A. tumefaciens. Esto fue una primera evidencia de una transformación tumoral.

Hemos determinado la presencia de plásmidos en A. rhizogenes 15834, cuyo tamaño se aproxima a 258 Md como había sido descrito. Estos plásmidos han sido caracterizados por microscopía electrónica, geles de agarosa y enzimas de restricción.

Hemos estudiado también las homologías existentes entre estos plásmidos y los de A. tumefaciens C58 y ACH5. Se ha establecido que las homologías se sitúan mayoritariamente en regiones comunes entre el pTiC58 y el pTiACH5, excepción hecha de la región T de estos plásmidos.

Mediante la síntesis de DNA complementario al mRNA de raíces inducidas por A. rhizogenes 15834, hemos comprobado la presencia en las células de raíz, de secuencias pertenecientes al pRi15834. El tamaño del fragmento integrado no se ha establecido completamente pero puede oscilar alrededor de los tamaños de los T-DNA de A. tumefaciens.

De esta manera pensamos que el hairy root se induce mediante la integración, en la célula vegetal, de un fragmento del pRi15834, que se transcribe y traduce, alterando por un lado el balance hormonal y sintetizando, por otro, compuestos (agropina, manopina), metabolizables por la bacteria.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aerts, M., M. Jacobs, J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu and J. Schell: Plant Sci. Lett. 17 (1979) 43-50.
- 2) Anand, V.K. and G.T. Heberlein: Amer. J. Bot. 64 (1977) 153-158.
- 3) Bedbrook, J.R., H. Lehrach and F.M. Ausubel: Nature 281 (1979) 447-452.
- 4) Beltrá, R.: Microbiol. Esp. 15 (1962) 13-33.
- 5) Benedict, S.R.: J. Biol. Chem. 5 (1908-1909) 485.
- 6) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th edition) (1974) Ed. R.E. Buchanan & N.E. Gibbons.
- 7) Bernaerts, M. and J. DeLey: Nature 197 (1963) 406-407.
- 8) Birnboim, H.C. and J. Doly: Nucleic Acids Research 7 (1979) 1513-1523.
- 9) Bomhoff, G., P. Klapwijk, H. Kester, R. Schilperoort, J.P. Hernalsteens and J. Schell: Molec. Gen. Genet. 145 (1976) 177-181.
- 10) Brewin, N., J. Beringer and A. Johnston: J. Gen. Microbiol. 120 (1980) 413-420.
- 11) Casey, J. and N. Davidson: Nucleic Acids Research 4 (1977) 1539-1552.
- 12) Casse, F., C. Boucher, J. Julliot, M. Michel and J. Dénarié: J. Gen. Microbiol. 113 (1979) 229-242.
- 13) Chater, K.: Nucleic Acids Research 4 (1977) 1989-1998.
- 14) Chilton, M.D., M. Drummond, D. Merlo, D. Sciaky, A. Montoya, M. Gordon and E. Nester: Cell 11 (1977) 263-271.
- 15) Chilton, M.D., R. Saiki, N. Yadav, M. Gordon and F. Quertie

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4060-4064.

- 16) Chilton, M.D., D. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-
Delbart and J. Tempé: Nature 295 (1982) 432-434.
- 17) Comai, L. and T. Kosuge: J. Bacteriol. 143 (1980) 950-
957.
- 18) Costantino, P., P. Hooykaas, H. Den Dulk-Ras and R. Schil-
peroort: Gene 11 (1980) 79-87.
- 19) Coxon, D., A. Davies, R. Fenwick, R. Self, J. Firmin, D.
Lipkin and N. Janes: Tetrahedron Letters 21 (1980)
495-498.
- 20) Crestfield, A., K. Smith and F. Allen: J. Biol. Chem.
216 (1955) 185-193.
- 21) Currier, T. and E. Nester: Anal. Biochem. 76 (1976) 431-
441.
- 22) De Beuckeleer, M., M. Leemers, G. De Vos, L. Willmitzer,
M. Van Montagu and J. Schell: Molec. Gen. Genet. 183
(1981) 283-288.
- 23) De Greve, H., H. Decraemer, J. Seurinck, M. Van Montagu
and J. Schell: Plasmid 6 (1981) 235-248.
- 24) Denhardt, D.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 (1966)
641-646.
- 25) Depicker, A., M. de Wilde, G. De Vos, R. De Vos, M. Van
Montagu and J. Schell: Plasmid 3 (1980) 193-211.
- 26) De Ropp, R.: Amer. J. Bot. 34 (1947) 248-261.
- 27) De Ropp, R.: Phytopathology 37 (1947) 201-206.
- 28) De Vos, G., M. De Beuckeleer, M. Van Montagu and J.
Schell : Plasmid 6 (1981) 249-253.
- 29) Drummond, M., M. Gordon, E. Nester and M.D. Chilton: Na-
ture 269 (1977) 535-536.

- 30) Ellis, J. and P. Murphy: Molec. Gen Genet. 181 (1981) 36-43.
- 31) Engler, G., A. Depicker, R. Maenhaut, R. Villarroel, M. Van Montagu and J. Schell: J. Mol. Biol. 152 (1981) 183-208.
- 32) Engler, G., M. Holsters, M. Van Montagu, J. Schell, J.P. Hernalsteens and R. Schilperoort: Molec. Gen. Genet. 138 (1975) 345-349.
- 33) Firmin, J. and Fenwick, G: Phytochemistry 16 (1977) 761-762.
- 34) Firmin, J. and Fenwick, G: Nature 276 (1978) 842-844.
- 35) Garfinkel, D. and E. Nester: J. Bacteriol 144 (1980) 732-743.
- 36) Garfinkel, D., R. Simpson, L. Ream, F. White, M. Gordon and E. Nester: Cell 27 (1981) 143-153.
- 37) Genetello, C., N. Van Larebeke, M. Holsters, A. Depicker, M. Van Montagu and J. Schell: Nature 265 (1977) 561-563.
- 38) Goldmann, A., D. Thomas et G. Morel: C.R. Acad. Sci. Paris 268 (1969) 852-854.
- 39) Guyon, P., M.D. Chilton, A. Petit, J. Tempé: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 2693-2697.
- 40) Hamilton, R. and M. Fall: Experientia 27 (1971) 229-230.
- 41) Hedges, R., V. Rodriguez-Lemoine and N. Datta: J. Gen. Microbiol. 86 (1975) 88-92.
- 42) Hernalsteens, J.P., F. Van Vliet, M. De Beuckeleer, A. Depicker, G. Engler, M. Leemers, M. Holsters, M. Van Montagu and J. Schell: Nature 287 (1980) 654-656.

- 43) Holmes, B. and P. Roberts: J. Appl. Bacteriol. 50 (1981) 443-467.
- 44) Holsters, M., J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu and J. Schell: "Molecular Biology of Plant Tumors", G. Kahl and J. Schell (Eds.). Academic Press, New York. (en prensa).
- 45) Holsters, M., B. Silva, F. Van Vliet, C. Genetello, M. De Blok, P. Dhaese, A. Depicker, D. Inzé, G. Engler, R. Vilarroel, M. Van Montagu and J. Schell: Plasmid 3 (1980) 212-230.
- 46) Hooykaas, P., H. Den Dulk-Ras, G. Ooms and R. Schilperoort: J. Bacteriol. 143 (1980) 1295-1306.
- 47) Hooykaas, P., C. Roobol and R. Schilperoort: J. Gen. Microbiol. 110 (1979) 99-109.
- 48) Hotchkiss, R.D.: Methods in Enzymology 3 (1957) 708-715. Academic Press, New York.
- 49) Hull, R. and R. Sheperd: Virology 79 (1977) 216-230.
- 50) Hyman, R., I. Brunovskis and W. Summers: J. Mol. Biol. 77 (1973) 189-196.
- 51) Jacob, A., J. Cresswell, R. Hedges, J. Coetzee, and J. Berlinger: Molec. Gen. Genet. 147 (1976) 315-323.
- 52) Jacob, F., S. Brenner and F. Cuzin: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 (1963) 329-348.
- 53) Jeffreys, A., and R. Flavell: Cell 12 (1977) 1097- 1108.
- 54) Johnson, R., R. Guderian, F. Eden, M.D. Chilton, M. Gordon and E. Nester: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 536-539.
- 55) Kemp, J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 (1977) 862-

868.

- 56) Kemp, J., E. Hack, D. Sutton and M. El-Wakil: Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers (1978) Vol. I, pp. 183-188.
- 57) Kerr, A.: Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers (1978) Vol. I, pp. 101-108.
- 58) Kerr, A., P. Manigault and J. Tempé: Nature 265 (1977) 560-561.
- 59) Kerr, A., and C. Panagopoulos: Phytopat. Z. 90 (1977) 172-179.
- 60) Kersters, K., J. De Ley, P. Sneath and M. Sackin: J. Gen. Microbiol. 78 (1973) 227-239.
- 61) Klapwijk, P., M. Oudshoorn and R. Schilperoort: J. Gen. Microbiol. 102 (1977) 1-11.
- 62) Klapwijk, P., T. Scheulderman and R. Schilperoort: J. Bacteriol. 136 (1978) 775-785.
- 63) Klecner, N.: Cell 11 (1977) 11-23.
- 64) Kleinschmidt, A.: Methods in Enzymology 12B (1968) 361-377.
- 65) Leemans, J., R. Deblaere, L. Willmitzer, H. De Greve, J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu and J. Schell: EMBO J. 1 (1982) 147-152.
- 66) Leemans, J., C. Shaw, R. Deblaere, H. De Greve, J.P. Hernalsteens, M. Maes, M. Van Montagu and J. Schell: J. Mol. Appl. Genet. 1 (1981) 149-164.
- 67) Lemmers, M., M. De Beuckeleer, M. Holsters, P. Zambryski, A. Depicker, J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu and J. Schell: J. Mol. Biol. 144 (1980) 353-376.
- 68) Lin, B. and C. Kado: Can. J. Microbiol. 23 (1977) 1554-1561.

- 69) Linsmaier, E. and F. Skoog: *Physiol. Plant.* 18 (1965) 100-127.
- 70) Lioret, C.: (1958) *Tesis, Doctorat d'Etat* (Paris).
- 71) Lippincott, J., R. Beiderbeck and B. Lippincott: *J. Bacteriol.* 116 (1973) 378-383.
- 72) Marko, A. and G. Butler: *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 165-176.
- 73) McCloskey, J., T. Hashizume, B. Basile, Y. Ohno and S. Sonoki: *FEBS Lett.* 111 (1980) 181-183.
- 74) McMaster, G. and G. Carmichael: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4835-4838.
- 75) Ménagé, A. and G. Morel: *Physiol. Vég.* 2 (1964) 1-8.
- 76) Ménagé, A. and G. Morel: *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 261 (1965) 2001-2002.
- 77) Meyers, J., D. Sánchez, L. Elwell and S. Falkow: *J. Bacteriol.* 127 (1976) 1529-1537.
- 78) Montoya, A., L. Moore, M. Gordon and E. Nester: *J. Bacteriol.* 136 (1978) 909-915.
- 79) Moore, L., G. Warren and G. Strobel: *Plasmid* 2 (1979) 617-626.
- 80) Murai, N., F. Skoog, M. Doyle and R. Hanson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 619-623.
- 81) Murashige, T. and F. Skoog: *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473-497.
- 82) Murray, K. and N. Murray: *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 551-564.
- 83) Nester, E. and T. Kosuge: *Ann. Rev. Microbiol.* 35 (1981) 531-565.

- 84) New, P. and A. Kerr: J. Appl. Bacteriol. 34 (1971) 233-236.
- 85) Novick, R., R. Clowes, S. Cohen, R. Curtiss III, N. Datta and S. Falkow: Bacteriol. Rev. 40 (1976) 168-189.
- 86) Old, R. and S. Primrose: "Principles of Gene Manipulation" p. 22. Blackwell Scientific Publications (1980).
- 87) Otten, L. and R. Schilperoort: Biochim. Biophys. Acta 527 (1978) 497-500.
- 88) Petit, A., J. Tempé, A. Kerr, M. Holsters, M. Van Montagu and J. Schell: Nature 271 (1978) 570-571.
- 89) Rigby, P., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg: J. Molec. Biol. 113 (1977) 237-251.
- 90) Roberts, G. and W. Brill: Ann. Rev. Microbiol. 35 (1981) 207-235.
- 91) Roberts, W., M. Tate and A. Kerr: Nature 265 (1977) 379-381.
- 92) Schell, J., M. Van Montagu, M. De Beuckeleer, M. De Block, A. Depicker, M. De Wilde, G. Engler, C. Genetello, J. P. Hernalsteens, M. Holsters, J. Seurinck, B. Silva, F. Van Vliet and R. Villarroel: Proc. R. Soc. Lond. B 204 (1979) 251-266.
- 93) Schröder, G. and J. Schröder: Molec. Gen. Genet. 185 (1982) 51-55.
- 94) Schröder, J., G. Schröder, H. Huisman, R. Schilperoort and J. Schell: FEBS Lett. 129 (1981) 166-168.
- 95) Southern, E.M.: J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-518.
- 96) Stonier, T.: J. Bacteriol. 79 (1960) 889-898.
- 97) Sutton, D., J. Kemp and E. Hack: Plant Physiol. 59 (1977)

108.

- 98) Tate, M., J. Ellis, A. Kerr, J. Tempé, K. Murray and K. Shaw: Carbohydr. Res. (1982) en prensa.
- 99) Tempé, J., P. Guyon, A. Petit, J. Ellis, M. Tate et A. Kerr: C.R. Acad. Sci. Paris D 290 (1980) 1173-1176.
- 100) Tempé, J., A. Petit, M. Holsters, M. Van Montagu and J. Schell: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 2848-2849.
- 101) Tepfer, D. et J. Tempé: C.R. Acad. Sci. Paris III 292 (1981) 153-156.
- 102) Thomashow, M., R. Nutter, a. Montoya, M. Gordon and E. Nester: Cell 19 (1980) 729-739.
- 103) Thomashow, M., R. Nutter, K. Postle, M.D. Chilton, F. Blattner, A. Powell, M. Gordon and E. Nester: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 6448-6452.
- 104) Uhlin, B. and K. Nordström: J. Bacteriol. 124 (1975) 641-649
- 105) Volvovitch, M., G. Drugeon and P. Yot: Nucleic Acids Research 5 (1978) 2913-2925.
- 106) White, F. and E. Nester: J. Bacteriol. 141 (1980) 1134-1141.
- 107) White, F. and E. Nester: J. Bacteriol. 144 (1980) 710-720.
- 108) Willmitzer, L., De Beuckeleer, M., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J.: Nature 287 (1980) 359-361.
- 109) Willmitzer, L., L. Otten, G. Simons, W. Schmalenbach, J. Schröder, G. Schröder, M. Van Montagu, G. De Vos and J. Schell: Molec. Gen. Genet. 182 (1981) 255-262.
- 110) Willmitzer, L., W. Schmalenbach and J. Schell: Nucleic Acids Research 9 (1981) 4801-4812.

- 111) Willmitzer, L., G. Simons and J. Schell: EMBO J. 1 (1982)
139-146.
- 112) Yadav, N., K. Postle, R. Saiki, M. Thomashow and M.D. Chilton: Nature 287 (1980) 458-461.
- 113) Yamada, S. and H. Itano: Biochym. Biophys. Acta 130 (1966)
538-540.
- 114) Zaenen, I., N. Van Larebeke, H. Teuchy, M. Van Montagu and
J. Schell: J. Mol. Biol. 86 (1974) 109-127.
- 115) Zambryski, P., M. Holsters, K. Kruger, A. Depicker, J.
Schell, M. Van Montagu and H. Goodman: Science (Wash.)
209 (1980) 1385-1391.

